

## THESIS / THÈSE

### MASTER IN BIOLOGY

#### Influence de la leptine sur l'activité des follicules ovariens de la brebis in vitro

VANDERWEYDEN, Audrey

*Award date:*  
2004

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**Influence *in vitro* de la leptine sur la sécrétion stéroïdienne de follicules  
ovariens de brebis**

VANDERWEYDEN Audrey

Résumé

La leptine, identifiée en 1994, est une hormone sécrétée par le tissu adipeux qui outre son rôle dans la satiété, l'équilibre énergétique et la thermorégulation, tient un rôle important dans le fonctionnement de l'axe reproducteur.

Ce travail a pour but de rechercher un effet direct de la leptine sur la sécrétion stéroïdienne des follicules ovariens.

La périfusion *in vitro* permet de suivre la dynamique de la réponse de follicules isolés à des traitements de conditionnement ou de stimulation.

Les résultats montrent que l'apport de leptine a déclenché une sécrétion faible mais significative d'oestradiol par les follicules de toutes classes de taille et de progestérone par les petits follicules.

Ce conditionnement n'a cependant pas influencé significativement la réponse des follicules à la stimulation gonadotrope. A ce niveau des recherches, il ne semble pas que l'action de la leptine sur la reproduction passe de manière prépondérante par un effet sur les sécrétions stéroïdiennes des follicules en croissance terminale. Mais cette étude, montrant la présence de récepteurs à la leptine sur les follicules ovariens, ouvre la porte à de nombreux autres essais.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

**Promoteur:** J.-L. Bister

**Co-promoteur:** R. Paquay

*Seule, je n'y serais pas arrivée.*

*C'est pourquoi, je tiens à remercier les personnes suivantes :*

*Le professeur Raymond Paquay, mon co-promoteur, pour l'accueil qu'il m'a réservée au sein de son département ainsi que pour l'intérêt qu'il a porté à ce mémoire,*

*Le Docteur Jean-Loup Bister, mon promoteur, pour son appui scientifique, ses réponses à mes nombreuses questions, sa gentillesse et pour l'accompagnement tout au long de ce travail,*

*Marie-Antoinette, pour son savoir-faire, ses conseils pratiques et son aide précieuse,*

*Mouad, pour ses connaissances en statistiques et son soutien moral,*

*Cécile, pour ses conseils et sa bonne humeur,*

*Pascale, pour son soutien moral et sa gentillesse*

*Jean-Claude, pour sa disponibilité et sa gentillesse,*

*Virginie et Daniel, mes collègues,*

*A tous un très grand merci pour les dissections et pour la petite pause café très agréable.*

*Je voudrais également remercier des gens tout à fait spéciaux pour moi :*

*Mes quatre très grandes amies et dans le même bain que moi : Céline, Hélène, Audrey et Vanessa pour leur soutien lors de ce travail mais également pour tous ces moments privilégiés passés ensemble et qui dureront encore j'espère, je ne les oublierai jamais et ce grâce à vous,*

*Mes autres très grands amis : Del, Pierre, Marie, Jérémie, Fred, Fabien, Violette pour ces années merveilleuses passées en votre compagnie, j'espère qu'il y en aura encore,*

*Aurélien, mon compagnon, pour m'avoir supporté et encouragé tout au long de ce travail mais également dans ma vie quotidienne,*

*Et enfin, les plus importants : mes parents, pour avoir toujours cru en moi, pour leur confiance et leur soutien tout au long de ces années d'études, de ce mémoire mais également de ma vie quotidienne. Merci également pour les petits plats préparés avec amour chaque semaine.*

*A vous tous encore une fois MERCI !*

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
<b>CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>8</b>
1. APPAREIL REPRODUCTEUR DE LA FEMELLE.....	9
1.1. Les ovaires.....	9
1.2. Les follicules.....	9
2. LES HORMONES IMPLIQUEES DANS LA REPRODUCTION.....	11
2.1. Les hormones hypothalamo-hypophysaires.....	11
2.1.1. La GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone).....	12
2.1.2. Nature des hormones gonadotropes.....	12
2.1.3. Sécrétion des hormones gonadotropes.....	13
2.1.4. Récepteurs à LH et à FSH.....	13
2.2. Les hormones ovariennes.....	14
2.2.1. Les oestrogènes.....	14
2.2.2. Les progestagènes.....	14
2.2.3. La biosynthèse des stéroïdes ovariens.....	14
3. LA LEPTINE.....	15
3.1. Généralités.....	15
3.2. Identification de la leptine.....	15
3.3. Facteurs régulateurs de la sécrétion de la leptine et de l'expression du gène de la leptine.....	16
3.4. Récepteurs à la leptine et signalling intracellulaire.....	17
3.4.1. Récepteurs à la leptine.....	17
3.4.2. Signalling intracellulaire.....	18
3.5. La leptine agit sur ses récepteurs au niveau central.....	19
3.6. La leptine agit centralement pour modifier l'activité de reproduction.....	20
3.7. Divers rôle de la leptine dans la fonction reproductive.....	22
3.7.1. Rôle de la leptine sur la puberté.....	22
3.7.2. Rôle de la leptine sur la fonction utérine.....	22
3.7.3. Rôle de la leptine sur la fonction placentaire.....	22
3.7.4. Rôle de la leptine sur la fonction ovarienne.....	23
A. Cellules de la granulosa.....	23
B. Cellules de la thèque.....	24
3.8. Effet <i>in vitro</i> de la leptine sur la sécrétion de stéroïdes.....	25
3.8.1. Influence de la leptine sur la sécrétion d'oestradiol.....	25
3.8.2. Influence de la leptine sur la sécrétion de progestérone.....	26
<b>CHAPITRE II : OBJECTIFS.....</b>	<b>27</b>
<b>CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>29</b>
1. CULTURE <i>IN VITRO</i> DES FOLLICULES OVARIENS DE BREBIS.....	30
1.1. But.....	30

1.2.	Matériel biologique.....	30
1.3.	Système de périfusion.....	30
1.4.	Stimulations des follicules <i>in vitro</i> .....	31
1.4.1.	Stimulations selon le modèle 1.....	32
	A. Préparation des solutions de leptine pour la périfusion.....	32
	B. Préparation de la solution de LH pour la périfusion.....	32
	C. Préparation de la solution de FSH pour la périfusion.....	32
1.4.2.	Stimulations selon le modèle 2.....	33
	A. Préparation des solutions de leptine pour la périfusion.....	33
	B. Préparation des solutions de LH pour la périfusion.....	33
	C. Préparation des solutions de FSH pour la périfusion.....	33
1.4.3.	Stimulations selon le modèle 3.....	34
	A. Préparation des solutions de leptine pour la périfusion.....	34
	B. Préparation des solutions de LH pour la périfusion.....	34
	C. Préparation des solutions de FSH pour la périfusion.....	34
2.	DOSAGES HORMONAUX PAR R.I.A. ....	35
2.1.	Principe.....	35
2.2.	Appareillage.....	35
2.3.	Dosage de l'oestradiol (E <sub>2</sub> ).....	35
2.3.1.	Principe.....	35
2.3.2.	Technique.....	36
2.4.	Dosage de la progestérone (P <sub>4</sub> ).....	36
2.4.1	Principe.....	36
2.4.2.	Technique.....	36
2.5.	Calcul des résultats.....	37
2.6.	Analyses statistiques.....	37
<b>CHAPITRE IV : RESULTATS .....</b>		<b>38</b>
1.	STIMULATIONS SELON LE MODELE 1.....	39
1.1.	Résultats.....	39
	A. Sécrétion d'E <sub>2</sub> en fonction du traitement à la leptine.....	40
	B. Sécrétion de P <sub>4</sub> en fonction du traitement à la leptine.....	41
1.2.	Discussion.....	43
2.	STIMULATIONS SELON LE MODELE 2.....	44
2.1.	Résultats.....	44
	A. Sécrétion d'E <sub>2</sub> en fonction du traitement à la leptine.....	45
	B. Sécrétion de P <sub>4</sub> en fonction du traitement à la leptine.....	46
	C. Influence de la leptine sur la sécrétion de stéroïdes.....	48
	Oestradiol.....	48
	➤ Effet direct de la leptine sur la sécrétion d'oestradiol.....	48
	➤ Effet direct de la leptine sur la sécrétion d'oestradiol par de petits, moyens et grands follicules.....	49

➤ Effet indirect de la leptine sur la réponse aux hormones gonadotropes.....	50
Progestérone.....	51
➤ Effet direct de la leptine sur la sécrétion de progestérone.....	51
➤ Effet direct de la leptine sur la sécrétion de progestérone par de petits, moyens et grands follicules.....	52
➤ Effet indirect de la leptine sur la réponse aux hormones gonadotropes.....	53
D. Sécrétion de stéroïdes en fonction de la taille des follicules.....	54
E. Comparaison entre les deux traitements gonadotropes.....	55
3. STIMULATIONS SELON LE MODELE 3.....	56
3.1. Résultats.....	56
3.2. Discussion.....	59
<b>CHAPITRE V : DISCUSSION.....</b>	<b>60</b>
1. CAUSES DE L'ECHEC DE CERTAINES EXPERIENCES.....	61
2. INFLUENCE DE LA TAILLE DU FOLLICULE.....	61
3. INFLUENCE DIRECTE DE LA LEPTINE SUR LES SECRETIONS STEROIDIENNES.....	61
4. INFLUENCE INDIRECTE DE LA LEPTINE SUR LA REPONSE A LA LH-FSH.....	62
<b>CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>66</b>

# *INTRODUCTION*

Sur bases des lectures bibliographiques et des expériences réalisées au laboratoire, nous savons que la leptine, identifiée en 1994, est une hormone sécrétée par le tissu adipeux et que celle-ci, outre son rôle dans la satiété, l'équilibre énergétique et la thermorégulation, tient un rôle important dans le fonctionnement de l'axe reproducteur.

Cette hormone agit sur des récepteurs spécifiques présents dans de nombreux tissus de l'organisme. Son action s'exerce, au moins en partie, au niveau du système nerveux central.

Dans l'hypothalamus, elle règle la sécrétion pulsatile de la GnRH, dans l'hypophyse, elle module la sécrétion des gonadotropines et tout porte à croire qu'elle agirait aussi directement sur les gonades et l'activité ovarienne.

Chez les femelles, elle contribue largement au contrôle de l'ovulation, informant l'axe hypothalamo-hypophysaire des réserves énergétiques qui sont une condition limitante pour mener à bien la fécondation, la gestation et la lactation.

Des études zootechniques, histologiques, de cultures cellulaires,...concordent pour laisser suspecter un effet direct de l'hormone sur l'ovaire. Ce travail a pour objectif de la mettre en évidence grâce à des techniques de stimulations *in vitro* de follicules ovariens isolés.



CHAPITRE I :

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

# **1. Appareil reproducteur de la femelle**

La fonction reproductrice comporte essentiellement : le transport des spermatozoïdes et de l'ovocyte vers les sites où ils s'unissent : la fécondation, l'implantation et le développement du fœtus : la gestation, la parturition (accouchement) et enfin la nourriture du nouveau-né grâce à la sécrétion de lait : la lactation.

L'appareil reproducteur femelle est composé de :

- Les ovaires
- Les oviductes ou trompes utérines
- L'utérus
- Le col
- Le vagin
- La vulve
- Les mamelles

Dans le cadre de ce mémoire, les ovaires vont attirer toute notre attention.

## **1.1. Les ovaires**

Les organes reproducteurs primaires, appelés également gonades, sont la paire d'ovaires chez les femmes et les femelles. Ces deux ovaires sont situés dans le petit bassin, l'un à droite, l'autre à gauche contre la paroi latérale de la cavité pelvienne.

Ces gonades ont un double rôle : d'une part, elles produisent les gamètes (ovocytes) et d'autre part elles sécrètent les hormones sexuelles : œstrogène et progestérone.

Chez la brebis, l'ovaire est un organe de forme ovoïde. Il mesure environ 3 à 4 cm de long, 1cm de large et 1cm d'épaisseur.

La structure de l'ovaire est faite de trois tissus (de la périphérie vers le centre) :

- L'albuginée : tissu conjonctif fibreux recouvrant l'ovaire.
- La zone corticale (ou périphérique) : elle contient les follicules ovariens aux diverses étapes de leur maturation.
- La zone médullaire : tissu nourricier au centre de l'ovaire garni de vaisseaux sanguins et de nerfs.

L'ovaire est composé de follicules, ce qui lui donne cet aspect irrégulier.

## **1.2. Les follicules**

Les follicules sont des formations sphériques situées en périphérie des ovaires contenant les ovocytes. Ils sont formés de trois couches cellulaires concentriques : la thèque externe, la thèque interne et la granulosa qui délimitent une cavité liquidienne ou antrum.

Ces follicules peuvent se trouver à différents stades : primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires, antraux et de De Graaf (figure 1).

- *Les follicules primordiaux* : ils sont présents dans la zone corticale de l'ovaire dès la naissance. Ils sont au nombre de 200 000 mais seulement un petit nombre se développera jusqu'à l'ovulation, les autres verront leur développement se stopper et subiront l'atréxie. Les follicules primordiaux se composent d'un ovocyte entouré de quelques cellules folliculaires.
- *Les follicules primaires* : ils comportent un ovocyte en croissance un peu plus volumineux entouré d'une couche régulière de quelques dizaines de cellules folliculaires.
- *Les follicules secondaires* : ils sont au stade où l'ovocyte a atteint sa taille maximale. Il est maintenant entouré d'une membrane pellucide les séparant des cellules folliculaires qui sont dès lors plusieurs milliers et forment une granulosa.
- *Les follicules tertiaires* : ils sont reconnaissables grâce aux nouveaux tissus qui s'organisent autour de la granulosa : la thèque interne formée de cellules glandulaires où sont synthétisés les oestrogènes, et la thèque externe formée de cellules aplaties, de fibres conjonctives et de vaisseaux sanguins afin de nourrir le follicule et de transporter les hormones.
- *Les follicules antraux* : ils vont se creuser d'une cavité remplie de liquide folliculaire au niveau de la granulosa : l'antrum. Ce liquide abondant va rejeter les cellules de la granulosa en périphérie, tandis que l'ovocyte porté par des cellules folliculaires, le cumulus oophorus, fait saillie dans l'antrum.
- *Les follicules de De Graaf* ou préovulatoires : ils sont les plus volumineux. L'aboutissement de la croissance terminale du follicule de De Graaf est l'ovulation, c'est-à-dire sa rupture et la libération de l'ovule vers le pavillon de l'oviducte.

Après l'ovulation, un caillot sanguin se forme pour remplir la cavité folliculaire, il est entouré des cellules de la thèque interne et de la granulosa. Ces cellules vont se multiplier et se charger de lutéine, un pigment caroténoïde jaune. Des vaisseaux sanguins vont alors se former à partir de la thèque pour irriguer cette nouvelle structure : le *corps jaune*.

Le corps jaune devient alors une glande endocrine à double rôle :

- Sa couche externe qui vient de la thèque interne sécrète de l'oestradiol en faible quantité
- Sa couche interne qui vient de la granulosa sécrète de la progestérone

Si la fécondation se produit, le corps jaune sera maintenu tout au long de la gestation.

Du stade progestatif, il passe au stade gestatif. Mais si la fécondation n'a pas lieu, le corps jaune progestatif régresse puis disparaît.

## 2. Les hormones impliquées dans la reproduction

L'hormone est une protéine fabriquée par une glande endocrine. Après avoir été déversée dans la circulation sanguine, elle agit à distance sur un organe cible pour en moduler le fonctionnement (feed-back positif ou négatif).

Les glandes exocrines sécrètent leur produit sur une surface libre ou dans les canaux. Ces canaux transportent les sécrétions dans les cavités corporelles, naturelles, dans la lumière des différents organes.

Les glandes endocrines sécrètent des hormones dans l'espace extra-cellulaire entourant les cellules sécrétrices. Ces sécrétions se rendent ensuite dans des vaisseaux capillaires et sont ensuite transportés par le sang.

### 2.1. Les hormones hypothalamo-hypophysaires

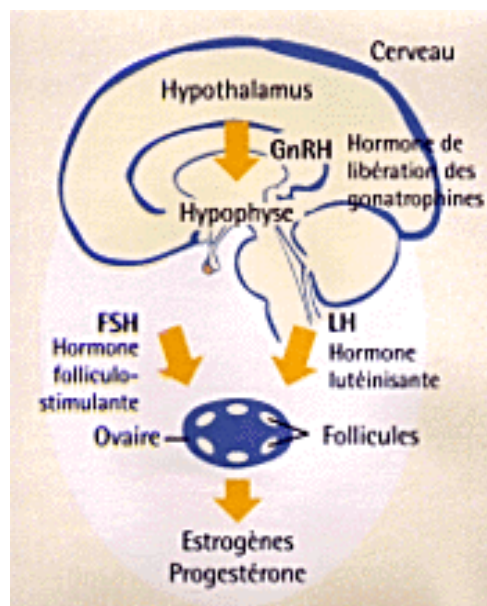


Figure 2 : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

L'hypothalamus sécrète la gonadolibérine (GnRH) qui stimule la libération des gonadotropines (LH et FSH) par l'hypophyse, qui elles-mêmes stimulent la production d'hormones sexuelles par les ovaires.

Les ovaires sont constitués de follicules et de corps jaunes qui sécrètent respectivement l'oestradiol et la progestérone.

Le complexe hypothalamo-hypophysaire est constitué de deux parties distinctes : l'hypothalamus et l'hypophyse.

L'hypothalamus est une région centrale du cerveau disposée à sa base juste au-dessus de l'hypophyse à laquelle elle est reliée anatomiquement, neurologiquement et vasculairement par la tige pituitaire.

L'hypothalamus est un centre intégrateur responsable de l'homéostasie. Il est en effet responsable des comportements de prise de nourriture et de boisson, de thermorégulation et de reproduction (gonostat). Le gonostat est assuré d'une part par la production de GnRH par l'hypothalamus, qui stimule la libération de gonadotropines par l'hypophyse.

L'hypophyse (ou glande pituitaire) est une glande endocrine située sous le cerveau et constituée de deux parties : l'adénohypophyse qui sécrète des hormones (FSH et LH) et la neurohypophyse qui sécrète des neurohormones synthétisées par des noyaux hypothalamiques. Les cellules hypophysaires sont sous le contrôle de l'hypothalamus et celles-ci commandent les organes internes de manière indirecte (Ulloa-Aguirre *et al*, 2000).

### **2.1.1. La GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone)**

La GnRH, sécrétée par les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus, est une neurohormone protéique, plus exactement un décapeptide, appelée gonadolibérine car elle agit sur les cellules de l'hypophyse en stimulant leur sécrétion de gonadotrophines (LH et FSH).

La régulation de la GnRH se fait selon un feed-back négatif et ce, grâce à elle-même. En effet, une concentration élevée en GnRH inhibe sa propre sécrétion. Elle est aussi inhibée par les gonadotropines libérées par l'hypophyse et par les stéroïdes libérés par l'ovaire.

La sécrétion de gonadolibérine est pulsatile, et tient sous son contrôle direct la sécrétion pulsatile de LH. Elle influence aussi la FSH, mais en contrôlant plutôt le niveau de sa synthèse plutôt que sa sécrétion.

La gonadolibérine exerce ses effets sur les cellules gonadotropes par l'intermédiaire des récepteurs spécifiques. Leur structure est encore incomplètement élucidée, mais on sait que leur mécanisme d'action se fait par l'intermédiaire du calcium. La liaison de la gonadolibérine à ses récepteurs entraîne l'ouverture des canaux calciques avec pour conséquence une augmentation du calcium intracellulaire dans la cellule gonadotrope. Le calcium se fixe sur son récepteur intracellulaire (calmoduline) et provoque l'exocytose des grains de sécrétion contenant la LH (Ulloa-Aguirre *et al*, 2000).

### **2.1.2. Nature des hormones gonadotropes**

La FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone) sont deux hormones glycoprotéiques synthétisées par l'hypophyse. Elles sont constituées chacune de deux sous-unités alpha, qui est commune aux deux hormones, et une sous-unité bêta, formée d'une séquence d'acides aminés spécifiques.

Chacune des sous-unités est formée d'une séquence polypeptidique porteuse d'une ou plusieurs chaînes polysaccharidiques. Le poids moléculaire est d'environ 28 000 Da pour la LH et de 34 000 Da pour la FSH, cette différence est due à leur contenu respectif en sucres, car le poids moléculaire des parties polypeptidiques est similaire pour les deux hormones (Minegishi *et al*, 1996).

### **2.1.3. Sécrétion des hormones gonadotropes**

La FSH est sécrétée tout le long du cycle sous forme de vagues et d'une décharge préovulatoire. Les vagues sécrétées correspondent aux croissances folliculaires et chaque maximum correspond à un recrutement de follicules. Le mode de sécrétion de la FSH n'est pas pulsatile.

La LH est une hormone à sécrétion pulsatile (la pulsatilité est commandée par la sécrétion elle-même pulsatile de GnRH).

Chez les femelles, en fin de phase folliculaire, les fortes quantités d'oestradiol sécrétées par l'ovaire vont stimuler l'hypothalamus et l'hypophyse ce qui va entraîner une décharge brutale et très importante de LH (pic de LH) qui va induire l'ovulation et la maturation ovocytaire. (Ulloa-Aguirre *et al*, 2000).

### **2.1.4. Récepteurs à LH et à FSH**

La FSH se lie à son récepteur membranaire, lié aux protéines Os, sur les cellules de la granulosa dans l'ovaire (et sur les cellules de Sertoli dans le testicule) (Ranniki *et al*, 1995).

Le récepteur de la FSH a été cloné il y a une dizaine d'années (Sprengel, 1999 ; Kelton, 1992 ; Tilly, 1992 in Ranniki *et al*, 1995). Il fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G qui comprend en particulier le récepteur de la LH, de la GnRH mais aussi de la rhodopsine, de l'acide muscarinique de l'angiotensine II et des catécholamines. La structure de ce récepteur peut être divisée en trois parties : un domaine extracellulaire en NH<sub>2</sub> terminal, un domaine comprenant sept passages transmembranaires hydrophobes et enfin, un domaine intracellulaire en COOH terminal (figure 3) (Minegishi *et al*, 1996).

Des expériences ont permis de localiser la région de haute affinité de liaison de l'hormone, cette région se situe dans la région NH<sub>2</sub> terminale.

L'action cellulaire de la FSH et de la LH, comme celle de la plupart des hormones polypeptidiques, s'effectue selon le schéma de Sutherland (figure 4) : le couplage de l'hormone à son récepteur entraîne une stimulation du système adénylate cyclase. Cette activation entraîne une accumulation de l'AMP cyclique intracellulaire. Ce second messenger se lie ensuite à la protéine kinase A.

La cascade d'activation engendre en particulier une stimulation de la stéroïdogenèse (Rannikki *et al*, 1995 and Minegishi *et al*, 1996).

L'action de chacune des gonadotropines dépend toutefois étroitement, à la fois de la cellule concernée, et du degré de différenciation du follicule.

La LH stimule les cellules de la thèque des follicules afin qu'elles sécrètent des androgènes servant de précurseurs à l'oestradiol mais elle stimule aussi le développement du corps jaune qui va sécréter de la progestérone.

Le rôle principal de la FSH est de contrôler le développement de l'ovaire ainsi que la croissance des follicules et le métabolisme cellulaire de ceux-ci. De cette façon, elle augmente la synthèse des stéroïdes, en particulier l'oestradiol au niveau de la granulosa, de même que le nombre de récepteurs à la LH (Ulloa-Aguirre *et al*, 2000).

N.B : Ce sont les rôles respectifs de la LH et de la FSH sur la stéroïdogenèse qui nous ont conduit à penser que la stimulation de LH suivie de FSH est la plus appropriée afin de réaliser nos expériences car notre but est de doser les quantités d'oestradiol émises par les follicules, stimulés avec les différentes hormones (Noël *et al*, 1999).

## **2.2. Les hormones ovariennes**

### **2.2.1. Les oestrogènes**

Les oestrogènes regroupent toutes les hormones stéroïdiennes qui ont pour effets biologiques d'assurer le développement de type femelle, la maturité de l'appareil génito-mammaire et le déroulement régulier du cycle oestral.

Le 17 bêta oestradiol ( $E_2$ ) est sécrété par les follicules ovariens et ce en quantité proportionnelle à la taille de ceux-ci. Son rôle principal est de produire l'oestrus grâce à un feed back positif de l'hypothalamus qui amplifie sa sécrétion jusqu'à une décharge importante aboutissant ainsi à une ovulation. Un feed back négatif est observé en présence de progestérone.

Au niveau de l'ovaire, l'oestradiol agit de deux façons différentes : elle stimule le métabolisme des follicules en favorisant de cette manière sa propre sécrétion, et elle a une action lutéolytique en synergie avec les prostaglandines utérines.

L'oestradiol au niveau de l'utérus stimule la production de  $PGF_{2\alpha}$ . En fin de période folliculaire, ceci provoque des contractions utérines favorisant la rencontre des spermatozoïdes et de l'ovule. Au cours de la phase lutéale, la synergie  $E_2$ - $PGF_{2\alpha}$  induit la lutéolyse (O'Malley et Strodt, 1991).

### **2.2.2. Les progestagènes**

La progestérone ( $P_4$ ) est une hormone capable de maintenir la gestation et d'assurer le bon fonctionnement du système reproducteur.

La progestérone est sécrétée par le corps jaune sous l'effet de la LH et exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GnRH bloquant de cette façon les décharges préovulatoires de FSH et de LH.

La progestérone agit de plusieurs manières sur l'utérus : elle inhibe les contractions utérines, provoque une augmentation des parois et augmente le métabolisme utérin (O'Malley et Strodt, 1991).

### **2.2.3. La biosynthèse des stéroïdes ovariens**

De façon très simplifiée, le départ de la synthèse des stéroïdes se situe au niveau du cholestérol, par la suite celui-ci se transforme en prégnénolone. Le prégnénolone va ensuite prendre place dans les mitochondries des cellules capables d'initier la stéroïdogenèse. Sa transformation en **progestérone** se fait dans les cellules thécales et granulosales. La progestérone subit ensuite une hydroxylation puis l'action d'une hydrolase qui conduit à la formation de l'androstènedione. A partir de celui-ci, il y a formation de testostérone et **d'oestrogènes** (figure 5) (Robel, 1991).

### **3. La leptine**

#### **3.1. Généralités**

La leptine, identifiée en 1994 par Zhang (Zhang *et al*, 1994), est une hormone protéique, apparentée à la famille des cytokines, principalement synthétisée et sécrétée par le tissu adipeux, mais également par le placenta, l'estomac et les muscles squelettiques.

Cette hormone est constituée de 167 acides aminés et possède un poids moléculaire de 16 kDa (figure 6).

Le nom leptine provient du grec « leptos » qui signifie mince (Goumenou *et al*, 2003).

Cette hormone agit sur des récepteurs spécifiques présents dans de nombreux tissus de l'organisme. Son action s'exerce, au moins en partie, au niveau du système nerveux central. C'est un facteur satiétogène et brûleur de calories qui agit, en partie, en inhibant l'expression hypothalamique du neuropeptide Y (NPY), ce dernier agissant lui-même comme stimulateur de l'appétit.

Outre son rôle dans la satiété, l'équilibre énergétique et la thermorégulation, la leptine tient une place centrale dans le développement et la régulation de la reproduction.

Dans l'hypothalamus, elle règle la sécrétion pulsatile de la GnRH, dans l'hypophyse, elle module la sécrétion des gonadotrophines, elle agirait aussi directement sur les gonades.

Chez les femelles, elle contribue largement au contrôle de l'ovulation, informant l'axe hypothalamo-hypophysaire des réserves énergétiques qui sont une condition limitante pour mener à bien la fécondation, la gestation et la lactation.

Ces actions sont décrites ci-après.

#### **3.2. Identification de la leptine**

Chez la souris, au moins deux anomalies génétiques responsables d'une obésité très importante ont été identifiées. Les souris ob/ob, qui ont un défaut du gène (ob) codant pour la leptine entraînant l'inactivation de l'hormone, se caractérisent principalement par un excès de tissu adipeux. Elles sont diabétiques et stériles. Par ailleurs, les souris db/db, qui présentent quant à elle un défaut dans le gène (db) codant pour le récepteur de la leptine, se caractérisent également par un excès de gras et sont aussi stériles. Des expériences de circulation croisée, ou parabiose, entre des souris normales, des souris ob/ob et des souris db/db montrent que la circulation du sang de souris normales chez des souris ob/ob réduit l'ingestion alimentaire et le poids corporel, alors qu'elle n'a pas d'effet chez les souris db/db (Coleman *et al*, 1973 et 1981 in Chemineau *et al*, 1999). Ces expériences indiquent clairement qu'il existe une substance hormonale présente chez les souris normales et active chez les souris déficientes génétiquement, capable de réguler l'ingestion alimentaire et, par conséquent, l'accumulation de réserves adipeuses.

L'utilisation des techniques de biologie et de génétique moléculaire a permis l'identification du gène en question (ob) et de la protéine (leptine) pour laquelle il code (Zhang *et al*, 1994).



### 3.3. Facteurs régulateurs de la sécrétion de leptine et de l'expression du gène de la leptine

Le facteur le plus important qui régule la sécrétion de leptine est la masse corporelle.

En particulier, il existe une plus grande corrélation positive entre le niveau de leptine et la masse totale du tissu adipeux qu'avec la graisse et l'index de masse corporelle (BMI) (Goumenou *et al*, 2003).

De plus, l'existence de fluctuations dans les valeurs de leptine pour chaque niveau de BMI suggère que d'autres facteurs, excepté la masse totale du tissu adipeux, régulent probablement la sécrétion de leptine. Il semble que l'âge au-delà de la puberté et la race n'affectent pas le niveau de leptine.

En général, le niveau de leptine est affecté par les facteurs nutritionnels et hormonaux.

Le jeûne réduit la sécrétion de leptine, tandis qu'une prise de nourriture excessive augmente la sécrétion de leptine. Dès lors, un jeûne de 24 heures réduit la valeur initiale du niveau de leptine de 30% (figure 7), tandis qu'une alimentation excessive pendant 12 heures augmente le niveau de leptine de 50% (Goumenou *et al*, 2003 and Schneider *et al*, 2000).

Le niveau de leptine augmente plus quand l'alimentation est riche en graisse (figure 8).

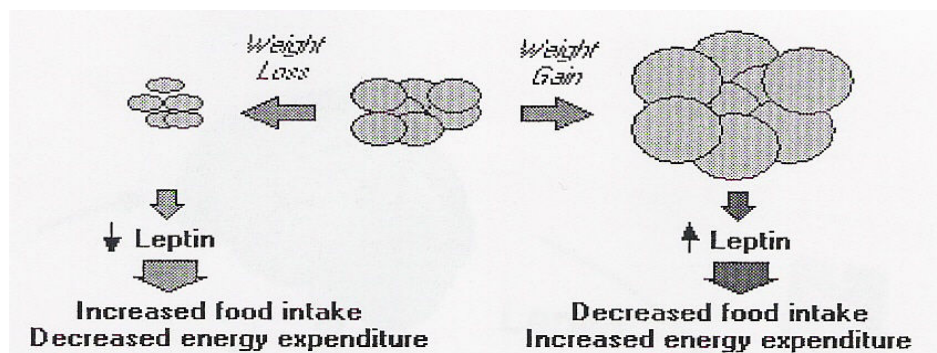


Figure 8 : Variations de la leptine en fonction du gain ou de la perte de poids (Holness *et al*, 1999)

Chez l'homme la sécrétion de leptine est hautement influencée par divers facteurs nutritionnels et hormonaux (figure 9).

Les glucocorticoïdes augmentent la sécrétion de leptine *in vitro* et *in vivo*, les catécholamines réduisent le niveau de leptine. L'insuline influence aussi la leptine mais c'est encore fort controversé, l'hyperinsulinémie à court terme n'a probablement pas d'effet sur la sécrétion de leptine, tandis que hyperinsulinémie à long terme ou la résistance à l'insuline augmente le niveau de leptine (Goumenou *et al*, 2003).

Il existe différents points de vue concernant l'action des oestrogènes sur la sécrétion de leptine (Goumenou *et al*, 2003).

Le fait que l'on trouve des récepteurs à oestrogènes dans le tissu adipeux supporte l'opinion que les oestrogènes sont probablement impliqués dans la sécrétion de leptine.

Les chercheurs qui se basent sur cette hypothèse avancent comme preuves :

- la modification de la transcription du gène ob dans le tissu adipeux après ovariectomie
- la réduction du niveau de leptine chez la souris ovariectomisée
- la réduction du niveau de leptine chez la femme ménopausée (Shimizu *et al*, 1997 in Goumenou *et al*, 2003)

D'un autre côté, il existe des données qui discréditent le fait que les oestrogènes favorisent la sécrétion de leptine :

- la réduction du niveau de leptine durant la ménopause n'est pas significatif
- l'administration d'une hormone de substitution chez la femme en âge post-ménopausal n'augmente pas le niveau de leptine
- l'administration de pilules contraceptives chez les femmes en âge de reproduction n'a aucun effet sur le niveau de leptine (Castracan *et al*, 1998 in Goumenou *et al*, 2003)

Les androgènes semblent réduire la sécrétion de leptine. Le niveau de la leptine est considérablement plus bas chez les hommes que chez les femmes (Segal *et al*, 1996 in Goumenou *et al*, 2003).

Les gonadotropines quant à elles ne jouent pas de rôle dans la sécrétion de leptine.

Chez les rongeurs, les glucocorticoïdes, l'insuline et le glucose stimulent l'expression du gène dans le tissu adipeux, alors que d'autres substances comme les antidiabétiques réduisent son expression (Saladin *et al*, 1996 in Chemineau *et al*, 1999).

Dans l'espèce ovine, le niveau alimentaire modifie fortement l'expression du gène de la leptine dans le tissu adipeux. Dans la même espèce, l'exposition aux jours longs, comparée aux jours courts, stimule également l'expression du gène, sans interaction avec la distribution de suppléments alimentaires (Bocquier *et al*, 1998, Chilliard *et al*, 1999).

### **3.4. Récepteurs à la leptine et signalling intracellulaire**

La leptine agit via des récepteurs transmembranaires (Ob-R), lesquelles montrent une similarité structurelle à ceux de la famille des cytokines (Sweeney, 2002).

#### **3.4.1. Récepteurs à la leptine**

Les récepteurs à la leptine ont été premièrement identifiés par l'expression des techniques de clonage.

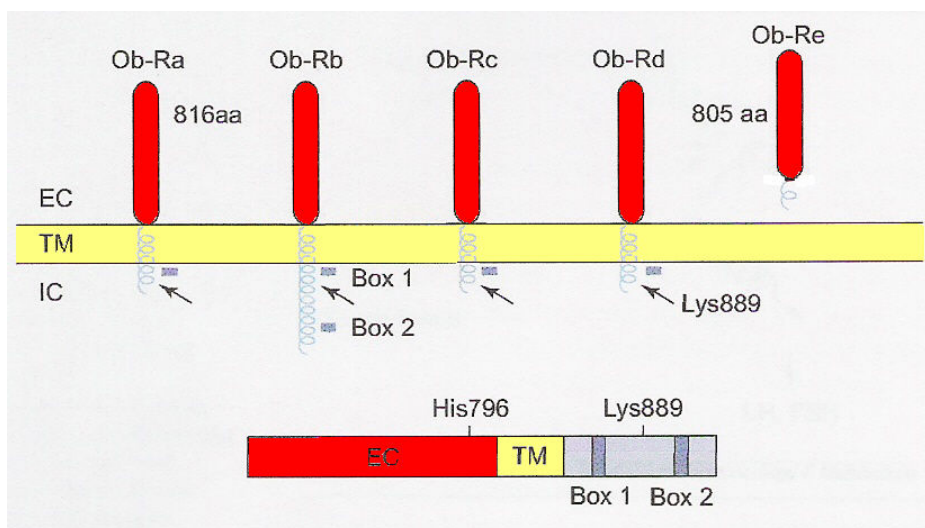
Le gène est alternativement épissé pour produire au moins six isoformes (Ob-Ra-Ob-Rf).

Chacun des Ob-Ra, ObRb, ObRc, Ob-Rd et Ob-Rf sont identiques dans leur domaine extracellulaire et transmembranaire. Le domaine extracellulaire du récepteur à la leptine est constitué de 816 acides aminés et possède deux motifs liant des cytokines (Trp-Ser-X-Ser-Trp).

Ob-Re diffère des autres isoformes par le fait qu'il lui manque un domaine transmembranaire et circule comme un récepteur soluble, de même il ne joue pas de rôle dans le signalling de la

leptine mais il est probablement important dans la détermination de la quantité de leptine active dans la circulation (Harvey *et al*, 2003 and Geissthövel *et al*, 2004).

Une « forme longue » du récepteur à la leptine contenant un domaine intracellulaire long existe (Ob-Rb), tandis que Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Rf possèdent tous des domaines intracellulaires courts (Sweeney, 2002). Ob-Rb est le seul à posséder les deux motifs protéiques Box 1 et Box 2 qui sont capables d'activer la voie JAK-STAT (Janus Kinase Signal Transducers and Activators of Transcription) qui permet d'initier la cascade du signalling intracellulaire (Caprio *et al*, 2001) (figure 10).



**Figure 10 :** Représentation schématique des différents isoformes du récepteur à la leptine (Caprio *et al*, 2001).

En général pour différentes espèces, les récepteurs à la leptine ont été découverts dans l'hypothalamus (Houseknecht *et al*, 1998 in Goumenou *et al*, 2003), dans la partie endocrine du pancréas (Kieffer *et al*, 1996 in Goumenou *et al*, 2003), dans les ovaires et les cellules de la granulosa du cumulus oophorus (Cioffi *et al*, 1996 in Goumenou *et al*, 2003), dans l'utérus (Cioffi *et al*, 1996 in Goumenou *et al*, 2003), ainsi que dans le rein, le cœur, les poumons, le foie et les muscles squelettiques. (Bernardis *et al*, 1998 and Sharma *et al*, 1998 in Goumenou *et al*, 2003)

### 3.4.2. Signalling intracellulaire

Le récepteur à la leptine est une protéine membranaire présentant de fortes homologues avec des membres de la famille des récepteurs aux cytokines de classe I.

Le signalling du récepteur à la leptine est initié par la liaison de la leptine au domaine extracellulaire du dimère Ob-Rb.

Les récepteurs aux cytokines de classe I contiennent des motifs (Box 1 et Box 2) hautement conservés, proche du domaine transmembranaire (Murakami *et al*, 1991 in Brann *et al*, 2002).

N.B. : Les isoformes du récepteur à la leptine liant la membrane contiennent un motif Box 1, seul l'isoforme Ob-Rb contient un motif Box 2 additionnel. L'isoforme Ob-Rb est aussi le seul récepteur à leptine possédant des résidus tyrosine intracellulaires, qui après phosphorylation, permettent une interaction avec des protéines de signalling spécifiques (Tartaglia *et al*, 1999 in Brann *et al*, 2002).

JAK 2 (Janus-activated Kinase 2) lie les motifs Box 1 et Box 2 sur le récepteur, aboutissant à la transphosphorylation et à l'activation de JAK 2.

JAK 2 activé phosphoryle les deux tyrosines (pY) sur le récepteur à leptine. Les deux tyrosines phosphorylées lient immédiatement SHP-2 (Src-homology domain 2 contenant une tyrosine phosphatase) et STAT-3 (transducteurs de signal et activateurs de la transcription), lesquelles sont alors phosphorylées par JAK 2.

MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase) se transloque dans le noyau, où il induit la transcription des gènes tels que *c-fos*, *c-jun* et *B-jun* ainsi que *egr-1* (Baumann *et al*, 1996 in Brann *et al*, 2002).

STAT-3 lié à la tyrosine phosphorylée se dimérise et se transloque dans le noyau, où il induit la transcription des gènes en réponse à STAT-3, incluant SOCS3 (Suppressor of Cytokines Signalling-3).

Après que l'ARNm de *socs3* ait été traduit et transloqué dans le cytoplasme, SOCS3 lie la tyrosine phosphorylée et bloque le chemin de SHP-2/MAPK/ERK et peut aussi lier JAK 2 directement pour réguler négativement le signalling du récepteur à la leptine (Kile *et al*, 2002) (figure 11).

Des études de transfection ont démontré que la liaison de la leptine au récepteur Ob-Rb résultait en une activation de la voie de signalling JAK/STAT, quant aux cellules transfectées avec le récepteur Ob-Ra, elles ne présentaient pas d'activation de la voie JAK/STAT par la leptine (Brann *et al*, 2002).

### **3.5. La leptine agit sur ses récepteurs au niveau central**

Chez les ovins, comme chez les autres espèces de mammifères, des récepteurs spécifiques de la leptine existent dans l'hypothalamus et l'hypophyse (l'axe hypothalamo-hypophysaire étant le centre de la fonction reproductive). Au niveau central, la forme longue du récepteur est sans doute la seule parmi au moins les cinq formes connues qui peut transduire le message. Le clonage partiel de cette forme longue chez l'ovine a permis de détecter les ARN messagers du récepteur dans les différentes parties du cerveau, en particulier l'hypothalamus et l'hypophyse (Dyer *et al*, 1997). L'utilisation de leptine marquée avec une molécule radioactive, a permis de mettre en évidence les sites de liaison qui marquent l'existence de récepteurs (Williams *et al*, 1999 in Chemineau *et al*, 1999).

Les types de neurones exprimant des ARN messagers du récepteur et qui sont donc les cibles potentielles de l'action de la leptine, ont été identifiés.

Chez les rongeurs, c'est le cas des neurones immunoréactifs au neuropeptide Y (NPY, un neuropeptide très répandu dans le cerveau des mammifères et connu pour être un stimulateur de la prise alimentaire, inhibiteur de la libération de GnRH) dans l'hypothalamus, des neurones immunoréactifs à la pro-opiomélanocortine (POMC, un peptide précurseur des opiacés endogènes inhibiteurs de la sécrétion de GnRH) dans le noyau arqué et des neurones immunoréactifs à la sérotonine (amine cérébrale, connue comme neuromédiateur modulateur de nombreuses fonctions, inhibiteur de la libération de GnRH) dans le noyau dorsal du raphé (Cunningham *et al*, 1999) (figure 12).

Chez le mouton, des neurones immunoréactifs à NPY ou portant ses ARNm, sont également porteurs des ARNm du récepteur de la leptine (Keisler *et al*, 1999).

*In vivo*, les neurones à GnRH ne semblent pas porter de récepteurs à la leptine. (Cunningham *et al*, 1999). L'ensemble de ces données indique qu'il existe très probablement des systèmes neuronaux intermédiaires entre la leptine et la régulation de l'activité des neurones à GnRH. Pour le moment, du fait que la leptine est impliquée dans différentes fonctions autres que la reproduction, il est difficile de connaître les sites et les neuromédiateurs qui participent réellement à la régulation de l'activité pulsatile des neurones à GnRH (Moschos *et al*, 2002).

Chez le mouton, l'injection intracérébrale de NPY diminue la pulsativité de LH (McShane *et al*, 1992 in Chemineau *et al*, 1999), alors que celle de leptine, pourtant active sur le NPY, n'a pas d'effet (Henry *et al*, 1999). Il est cependant assez probable qu'une partie au moins de l'effet de la leptine sur l'activité reproductrice passe, au niveau central, par les neurones à NPY. Néanmoins, l'inactivation du gène du NPY chez la souris n'empêche pas la reproduction de ces animaux, ce qui suggère que d'autres voies sont empruntées par la leptine pour agir sur la libération de la GnRH (Erickson *et al*, 1996).

La leptine exerce ses effets centraux à travers plusieurs systèmes neuroendocriniens incluant donc le neuropeptide Y mais aussi les mélanocortines, le CRH (corticotrophin releasing hormone) et le CART (cocaïne-and amphetamine-regulated transcript) (Trayhurn *et al*, 1999).

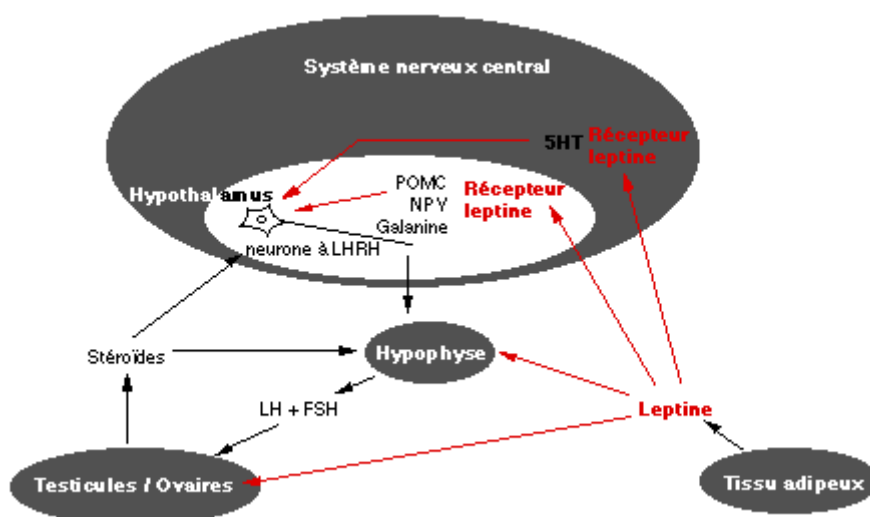


Figure 12 : Actions de la leptine sur ses récepteurs (Chemineau *et al*, 1999).

### 3.6. La leptine agit centralement pour modifier l'activité de reproduction

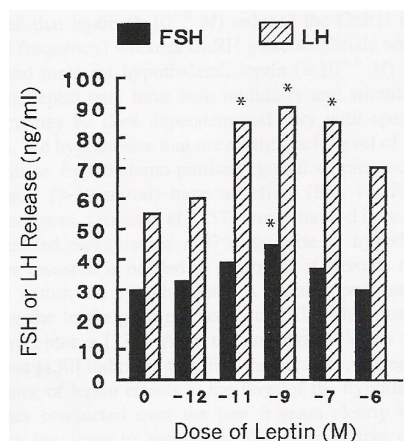
Plusieurs arguments montrent que la leptine agit sur la fonction de reproduction. La plupart des expériences concernant les effets de la leptine sur la fonction de reproduction sont réalisées chez les rongeurs, quelques-unes le sont chez des mammifères de plus grande taille.

Chez la souris ob/ob, stérile, l'injection de leptine recombinante au niveau de l'hypophyse restaure l'activité sexuelle, en même temps qu'elle diminue l'ingestion et les quantités de lipides corporels à des niveaux normaux. Cette injection augmente, chez les femelles, les concentrations plasmatiques de LH et chez les mâles, les concentrations plasmatiques de FSH.



De la même façon que chez les femelles rats adultes, un traitement de huit jours avec un antisérum de leptine cause une baisse de l'amplitude des pulses de LH et de la concentration plasmatique de LH (Spicer *et al*, 2001 and Ogura *et al*, 2001) (Figure 13).

Chez la souris normale, la leptine administrée par voie centrale, stimule la libération de LH et augmente la réponse LH et FSH *in vitro* des cellules hypophysaires traitées par GnRH (Yu *et al*, 1997).



**Figure 13 :** Effet stimulateur de la leptine sur les quantités de FSH et de LH sécrétées par l'hypophyse chez le rat (Spicer *et al*, 2001).

Bien que l'effet majeur de la leptine soit sans doute exercé au niveau hypothalamique, un effet périphérique ne peut pas être exclu. En effet, chez le rat, des ARNm du récepteur court de la leptine ont été mis en évidence dans l'ovaire, l'utérus et le testicule, ce qui suggère qu'elle pourrait agir sur ces organes (Zamorano *et al*, 1997). Dans cette même espèce, *in vitro*, la leptine diminue la sécrétion d'oestradiol induite par FSH et IGF-I (Zachow *et al*, 1997), ce qui suggère un possible effet sur l'ovaire *in vivo*.

Chez le singe à jeun depuis 48 heures, l'injection de leptine rétablit en totalité l'activité pulsatile de la LH, augmente la FSH plasmatique et la testostérone, alors qu'elle provoque une diminution du cortisol (Cunningham *et al*, 1999).

Chez l'homme, diverses corrélations ont été établies entre des perturbations de l'activité de reproduction et la concentration plasmatique de leptine.

Chez les animaux domestiques au niveau central, il n'existe pas de résultats concernant des modifications de l'activité de reproduction associées à une modification de la leptinémie (Henry et Clarke, 1999).

Quelles que soient les espèces, de nombreux auteurs ont montré l'importance primordiale d'autres hormones ou métabolites, comme l'insuline ou le glucose, dans la régulation nutritionnelle de l'activité de reproduction : la leptine n'est donc pas l'unique hormone capable d'expliquer les interrelations existant entre l'état des réserves et les structures hypothalamiques impliquées dans la fonction de reproduction, mais fait plutôt partie du réseau de composés qui agissent sur celles-ci afin de réguler l'activité des neurones à GnRH et la réponse hypophysaire à celui-ci (Chemineau *et al*, 1999).

### 3.7. Divers rôles de la leptine dans la fonction reproductive

Outre ses rôles sur l'hypothalamus et l'hypophyse, la leptine exerce également des fonctions sur la puberté, l'utérus, le placenta et l'ovaire (granulosa et thèque) (figure 14).

#### 3.7.1. Rôle de la leptine sur la puberté

Les premières expériences suggèrent que la leptine est un régulateur du début de la puberté chez la souris femelle et les rats mais pas chez le singe male (Cunningham *et al*, 1999).

Les concentrations de leptine augmentent durant la puberté chez les hommes et les femmes mais cette augmentation est seulement maintenue chez les femmes alors que les concentrations de leptine diminuent après la puberté chez les hommes (figure 15) (Spicer *et al*, 2001 and Issad *et al*, 1998).

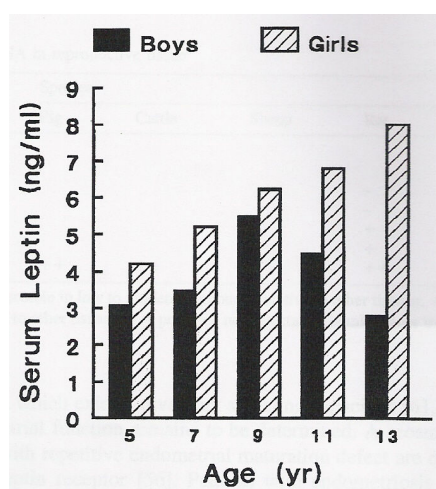


Figure 15 : Changement de concentrations de leptine durant la puberté chez les humains (Spicer *et al*, 2001).

Cette diminution du niveau de leptine après la puberté chez les males est due à une inhibition par la testostérone (Spicer *et al*, 2001).

#### 3.7.2. Rôle de la leptine sur la fonction utérine

Bien que l'ARNm de la leptine n'est pas détectable dans le tissu utérin du rat et de la souris, l'ARNm du récepteur à la leptine augmente dans l'utérus durant la gestation chez le rat, mais sa fonction reste inconnue.

Similairement, l'endomètre humain exprime l'ARNm du récepteur à la leptine et les taux de celui-ci présentent une augmentation pendant la phase post-ovulatoire qui est en relation avec l'implantation possible de l'embryon. Par conséquent, la leptine pourrait jouer un rôle dans le développement prématuré de l'embryon (Spicer *et al*, 2001).

#### 3.7.3. Rôle de la leptine sur la fonction placentaire

Les ARNm du récepteur à la leptine placentaire sont présents chez les singes, les humains, les souris et les rats, et leurs niveaux augmentent durant la gestation (Spicer *et al*, 2001).

### **3.7.4. Rôle de la leptine sur la fonction ovarienne**

Beaucoup d'expériences indiquent que la leptine a une action directe sur l'ovaire.

Premièrement, chez l'homme, la granulosa ovarienne et les cellules de la thèque (Spicer *et al*, 1998) possèdent des récepteurs de haute affinité pour la leptine.

Deuxièmement, l'ARNm du récepteur à la leptine a été identifié dans l'ovaire humain adulte l'ovaire de rat et les cellules de la thèque et de la granulosa humaines, les oocytes de souris et l'ovaire de porc. En fait, l'ovaire chez l'homme et le porc possède le plus haut niveau d'ARNm du récepteur à la leptine comparé aux autres organes (Cioffi *et al*, 1996 and Lin *et al*, 2000 in Spicer *et al*, 2001).

Troisièmement, chez l'homme, la leptine a des effets directs sur les cellules de la granulosa *in vitro* (Karlsson *et al*, 1997).

Quatrièmement, le traitement à la LH avec de la leptine diminue le taux d'ovulation de 77% comparé au traitement à la LH seule dans des ovaires entiers de rat qui ont été prétraités avec de la FSH (Duggal *et al*, 2000 in Spicer *et al*, 2001).

Ensemble, ces études indiquent que l'ovaire est probablement un organe cible de la leptine.

#### **A. Cellules de la granulosa**

*In vitro*, dans l'ovaire bovin, la leptine est un antagoniste direct de l'effet stimulateur de l'insuline sur la stéroïdogenèse dans la granulosa et, quand l'insuline est absente, la leptine produit peu ou pas d'effet sur la stéroïdogenèse dans les cellules de la granulosa. De plus, la leptine est un puissant inhibiteur de l'activité aromatase induite par l'insuline surtout dans les cellules non différenciées ( $IC_{50} = 30$  ng/ml) de la granulosa et moins dans les cellules différenciées ( $IC_{50} = 90$  ng/ml) (Spicer *et al*, 2001) (figure 16).

Cette information implique que le nombre de récepteurs dans les cellules de la granulosa diminue au fur et à mesure que le follicule grossit et se développe, rendant ainsi les follicules matures moins sensibles aux effets négatifs de la leptine.

Comme la concentration en leptine plasmatique chez les femmes maigres et obèses se situent dans une marge de, respectivement, 2 à 10 ng/ml et de 10 à 100 ng/ml, ces résultats *in vitro* indiquent que la leptine doit avoir un impact direct sur la fonction ovarienne des cellules de la granulosa (Spicer *et al*, 2001).

La leptine inhibe la production d'oestradiol induite par IGF-I (Insulin Growth Factor) et TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor) (figure 17) au niveau des cellules de la granulosa de rat mais elle n'a aucun effet sur cette même production d'oestradiol dans les cellules de la granulosa de bovin, sur la production de progestérone induite par la FSH au niveau de la granulosa de rat, ou encore sur la production de progestérone et d'oestradiol induite par la LH au niveau des ovaires de rat (Ryan *et al*, 2003 and Smith *et al*, 2002).



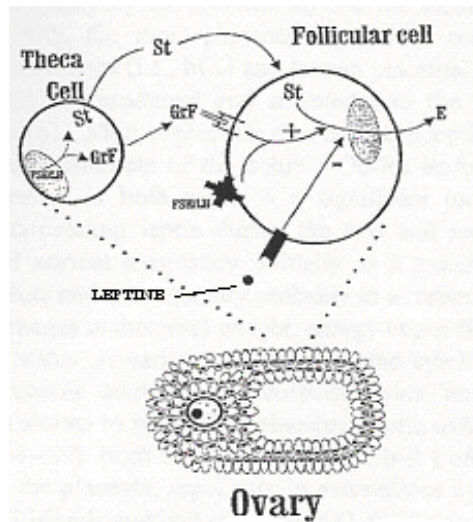


Figure 17 : Inhibition par la leptine de la production d'oestradiol induite par IGF-I et  $TGF\alpha$  (Moschos *et al*, 2002).

St : précurseurs stéroïdiens, GrF : facteurs de croissance, E : oestradiol.

Zachow et Magoffin ont découvert que la leptine inhibe la production d'oestradiol induite par la FSH et l'IGF-I, à moins de 30% quand la FSH est à dose optimale, et à plus de 80% quand la FSH est à dose sub-optimale. Donc, la dose de FSH influence beaucoup la magnitude de l'inhibition de la stéroïdogenèse induite par IGF-I provoquée par la leptine.

Dans des cultures cellulaires de granulosa humaine, la leptine inhibe la production d'oestradiol induite par la FSH et l'IGF-I et la production d'oestradiol induite par la LH en présence de 1% de sérum fœtal bovin (Spicer *et al*, 2001).

## B. Cellules de la thèque

La leptine est aussi un antagoniste direct des effets stimulateurs de l'insuline sur la stéroïdogenèse dans les cellules de la thèque chez les bovins. La leptine inhibe aussi la production d'androstènedione induite par l'IGF-I et la LH au niveau des cellules de la thèque bovine, mais pas dans les cellules thécales humaines (figure 18). Comme mentionné plus haut, la concentration de leptine plasmatique chez les femme maigres et les femmes obèses sont dans une gamme de, respectivement, 2 à 10 ng/ml et 10 à 100 mg/ml donc, la concentration plasmatique de leptine pourrait avoir un impact plus important sur la fonction ovarienne des cellules thécales que sur la fonction ovarienne des cellules de la granulosa à la fois chez des individus maigres et obèses (Spicer *et al*, 2001).

Bien que le point d'action de la leptine sur la stéroïdogenèse des cellules de la thèque requière aussi des études approfondies, l'effet inhibiteur de la leptine sur l'action de l'insuline n'est pas médié par une inhibition directe de son récepteur. De plus, les effets *in vitro* observés sur les cellules thécales bovines ne sont pas dus à un changement de viabilité cellulaire car ni l'insuline, ni la leptine n'ont d'effet sur la viabilité des cellules thécales ensemble ou séparément. La leptine (3 et 100 ng/ml) n'a pas non plus d'effet sur la prolifération basale ou induite par l'IGF-I. Bien que l'effet positif de la leptine sur la prolifération des cellules thécales induites par l'insuline soit en accord avec l'effet positif de la leptine sur la reproduction et la croissance cellulaire chez les souris *ob/ob*, l'effet inhibiteur de la leptine sur la stéroïdogenèse des cellules thécales quant à lui ne l'est pas. Donc, les informations *in vitro*

récentes indiquent que la leptine pourrait exercer un effet inhibiteur direct sur la fonction ovarienne *in vivo* en inhibant la stéroïdogenèse à la fois au niveau des cellules de la thèque et des cellules de la granulosa, conduisant ainsi à une diminution de la sécrétion d'oestradiol (Spicer *et al*, 2001).

On émet donc l'hypothèse qu'une concentration de leptine en augmentation mais modérée (<10 ng/ml) lors de l'apparition de la puberté ou d'ingestion de nourriture après un été de privation nutritionnelle, agit pour déclencher l'axe reproducteur au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Dans un environnement pauvre en leptine (par exemple la malnutrition), la fonction ovarienne est dirigée principalement par les gonadotropines et le complexe insuline/IGF-I. Dans un environnement avec un taux de leptine modérée à élevée (par exemple l'obésité), l'ovaire est empêché de « surproduire » de l'oestradiol grâce à l'effet inhibiteur de la leptine sur la production d'androstènedione induite par l'insuline au niveau des cellules de la thèque et à son activité aromatasase au niveau des cellules de la granulosa (Spicer *et al*, 2001).

La raison pour laquelle la leptine a un effet positif sur la reproduction et la fonction ovarienne chez les souris *ob/ob* mais négatif sur la stéroïdogenèse des cellules ovariennes *in vitro* n'est pas encore éclaircie. Cette absurdité apparente peut-être expliquée par les multiples sites d'actions possibles de la leptine au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadal *in vivo* (Spicer *et al*, 2001).

### **3.8. Effet *in vitro* de la leptine sur la sécrétion des stéroïdes par des follicules porcins à différents stades traités avec LH et FSH**

Chez le porc, le rôle de la leptine exogène dans la stéroïdogenèse folliculaire n'est pas complètement élucidé. Dans cette étude, des follicules porcins de trois tailles différentes sont prélevés (petits, moyens et grands c'est-à-dire préovulatoires).

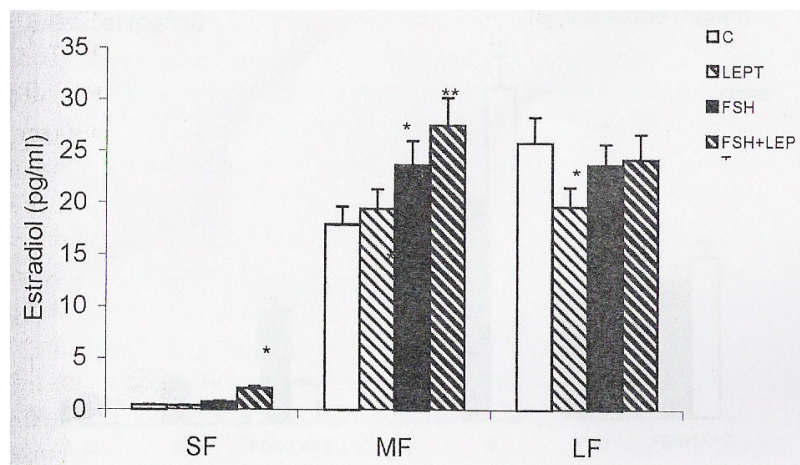
Les follicules sont mis en culture en présence de leptine ovine recombinante avec ou sans LH (100 ng/ml) ou FSH (100 ng/ml). Les concentrations d'oestradiol ( $E_2$ ) et de progestérone ( $P_4$ ) sont déterminées après 48 h de culture (Gregoraszcuk *et al*, 2002).

#### **3.8.1. Influence de la leptine sur la sécrétion d'oestradiol**

La leptine à une dose de 2 ng/ml n'a pas d'effet sur la sécrétion d' $E_2$  par des petits et moyens follicules mais diminue la sécrétion d' $E_2$  par des grands follicules.

La FSH ne stimule pas la sécrétion d' $E_2$  par des petits et grands follicules, tandis que les follicules moyens y répondent positivement.

Il existe également une action synergique significative de la FSH avec la leptine sur la sécrétion d'oestradiol par des petits et moyens follicules (Gregoraszcuk *et al*, 2002) (figure 19).



**Figure 19** : Effet de la leptine sur la sécrétion d'œstradiol.

C. : Contrôle, SF : petits follicules, MF : follicules moyens, LF : grands follicules.

Les concentrations hormonales de chaque groupe sont comparées à leur contrôle respectif.

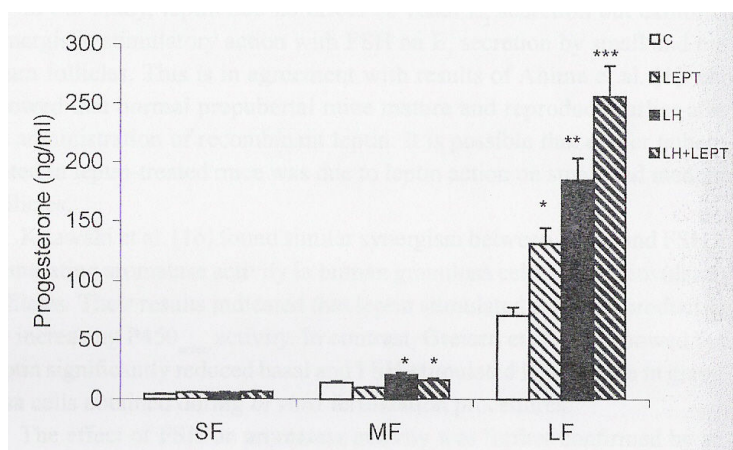
\* : significatif, \*\* : hautement significatif (Gregoraszczyk *et al*, 2002).

### 3.8.2. Influence de la leptine sur la progestérone

La leptine à une dose de 2 ng/ml n'a pas d'effet sur la sécrétion de P<sub>4</sub> par des petits et moyens follicules mais augmente largement la sécrétion de P<sub>4</sub> par des grands follicules.

La LH n'a pas d'effet sur la sécrétion de P<sub>4</sub> par de petits follicules mais stimule la sécrétion de par des moyens et grands follicules.

De même, il existe une action synergique hautement significative de la LH avec la leptine sur la sécrétion de progestérone par des grands follicules (Gregoraszczyk *et al*, 2002) (figure 20).



**Figure 20** : Effet de la leptine sur la sécrétion de progestérone.

C. : Contrôle, SF : petits follicules, MF : follicules moyens, LF : grands follicules.

Les concentrations hormonales de chaque groupe sont comparées à leur contrôle respectif.

\* : significatif, \*\* : hautement significatif, \*\*\* : très hautement significatif (Gregoraszczyk *et al*, 2002).

Les résultats de cette étude indiquent qu'il y a une maturation dépendant de l'action la leptine sur la sécrétion d'œstradiol et de progestérone. Ils suggèrent également une action synergique de la leptine et de la FSH sur la sécrétion d'œstradiol par des petits et moyens follicules et de même que la leptine et la LH sur la sécrétion de progestérone par des grands follicules chez le porc (Gregoraszczyk *et al*, 2002).

CHAPITRE II :

OBJECTIFS

Sachant que la leptine a un effet évident sur la reproduction et sachant également que l'ovaire peut être capable de réagir directement à la leptine, des expériences ont été mises en place. Ces expériences ont pour objectif de confirmer l'effet de la leptine sur l'ovaire.

Pour ce faire, les follicules sont périfusés *in vitro* avec un pré-conditionnement à court terme avec des taux de leptine différents suivis d'une stimulation standardisée LH-FSH.

Les sécrétions stéroïdiennes mesurées après l'administration de leptine, mais avant la stimulation gonadotrope, devraient pouvoir nous renseigner sur une éventuelle action directe sur les sécrétions folliculaires.

Après la stimulation, nous pouvons étudier l'influence de l'hormone sur la réponse des follicules à un traitement standardisé aux hormones gonadotropes.

## CHAPITRE III :

## MATERIEL ET METHODES

# **1. Culture *in vitro* de follicules ovariens de brebis**

Une stimulation standardisée des follicules ovariens *in vitro* a été mise au point au laboratoire (Noël *et al*, 1994, 1999).

## **1.1. But**

Le but de cette manipulation est d'étudier les effets d'une pré-incubation en présence de concentrations variables de leptine sur la réponse stéroïdienne à une stimulation standardisée avec de la LH et de la FSH.

## **1.2 Matériel biologique**

Les ovaires de brebis sont prélevés aux abattoirs d'Anderlecht au moment de l'abattage et sont transportés dans du milieu minimum (TCM199 de la firme BioWhittaker™) maintenu à une température de 4°C. Les follicules sont disséqués dès l'arrivée au laboratoire, à l'aide de ciseaux de microchirurgie, ensuite ils sont pesés et mesurés. Seuls les follicules de 4 à 6 mm sont prélevés mais également ceux dépassant la norme supérieure.

Les follicules sont alors répartis en 4 groupes de 6 follicules classés par ordre croissant de taille.

### ***Remarques importantes :***

- La qualité des ovaires est souvent inégale d'un prélèvement à l'autre et varie selon l'état corporel, l'âge ou l'état physiologique des brebis, c'est pourquoi, après la 1<sup>ère</sup> expérience, les brebis gestantes et les agnelles étaient écartées des analyses.
- Le délai entre le début de la récolte et la mise en culture est important. Un temps de 2 ou 3 h a été considéré comme un maximum à ne pas dépasser.

## **1.3 Système de périfusion**

La technique de culture *in vitro* utilisée au laboratoire est la périfusion.

Celle-ci garantit la survie des follicules pendant au moins 10 heures et permet d'examiner la dynamique des sécrétions stéroïdiennes et l'influence d'un traitement hormonal administré *in vitro* sur ces sécrétions.

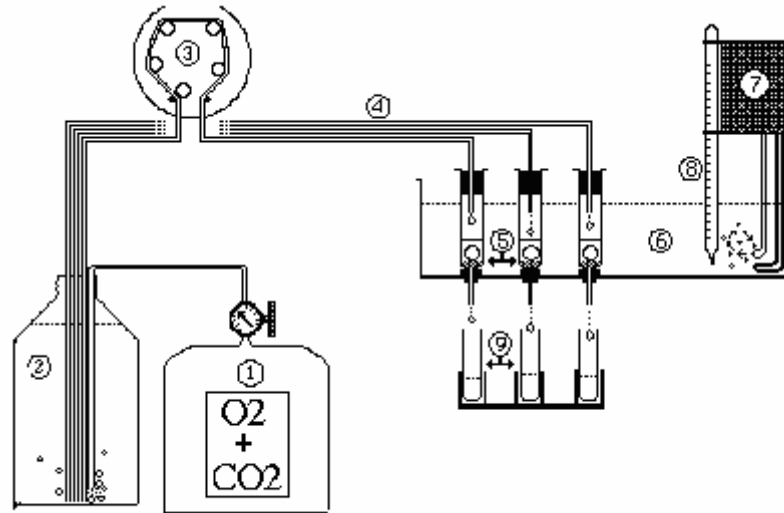
Le système de périfusion a pour principe d'isoler les follicules dans des chambres maintenues à 37°C et de les périfuser à l'aide d'un milieu spécifique (TCM199 de la firme BioWhittaker™).

Le fond du bassin, qui contient l'eau thermostatée, est percé de trous dans lesquels s'adaptent des bouchons en caoutchouc. Des seringues de 2 ml, servant de chambre de culture, sont plantées dans ces bouchons par des aiguilles qui les traversent de part en part. Un filtre est déposé dans le fond de ces seringues servant ainsi de support aux follicules.

Les seringues sont fermées hermétiquement par un bouchon de caoutchouc percé d'une aiguille par laquelle le milieu est injecté. La thermostatation et l'homogénéisation du bain-marie sont assurées par une pompe thermostatique (Thermomix 1441) tandis que la périfusion est, elle, assurée par une pompe péristaltique (Watson-Marlow 505S) qui assure un débit constant dans chaque seringue par des microtubes en Tygon.

Le milieu est périfusé goutte à goutte. A la sortie de chaque seringue, des tubes recueillent le milieu périfusé, ceux-ci sont changés toutes les 30 minutes et ensuite congelés en vue des dosages.

Ce système permet de se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques. Le milieu est continuellement renouvelé, évitant ainsi l'accumulation de métabolites. Les sécrétions peuvent être établies pour chaque follicule selon un mode cinétique. Les follicules peuvent être soumis *in vitro* à des stimulations hormonales réalisées de façon continue ou pulsatile.



**Figure 21 : Système de périfusion.** 2 : milieu de culture ; 3 : pompe péristaltique ; 4 : tuyau en tygon ; 5 : chambre de culture ; 6 : bain thermostaté ; 7 : pompe péristaltique ; 8 : thermomètre ; 9 : tubes collecteurs (Noël *et al*, 1999)

#### 1.4 Stimulations des follicules *in vitro*

Une stimulation standardisée des follicules ovariens *in vitro* a été mise au point au laboratoire : elle se déroule pendant 6 heures durant lesquelles on effectue des récoltes toutes les 30 minutes en vue d'étudier la quantité d'oestradiol et de progestérone sécrétée par follicules.

Elle a été adaptée lors de cette expérience en prolongeant la stimulation à la leptine et la durée entre ce conditionnement et l'administration de LH afin de distinguer un effet direct de la leptine sur la sécrétion stéroïdienne et un effet indirect sur la réponse aux stimulations gonadotropes LH-FSH.

Le programme de périfusion est établi comme suit et dure maintenant 7 heures 30 :

0h00 : Mise en culture des follicules dans 500µl de TCM199 à 37°C

0h00-1h00 : TCM199

1h00-2h00 : TCM199 + Leptine

2h00-3h00 : TCM199

3h00-3h20 : TCM199 + LH (10 ng/ml)

3h20-3h30 : TCM199

3h30-4h30 : TCM199 + FSH (15 ng/ml)

4h30-7h30 : TCM199



#### **1.4.1. Stimulations selon le modèle 1**

Sur 24 follicules périfusés :

Follicules	1 → 6	7 → 12	13 → 18	19 → 24
Leptine	0 ng/ml	1 ng/ml	5 ng/ml	20 ng/ml
LH	10 ng/ml			
FSH	15 ng/ml			

N.B. : L'appareillage tourne à 1,25 rpm.

Débit de 1,45 ml/30min./tube => 34,8 ml/30 min. /24 tubes.

#### **A. Préparation des solutions de leptine pour la périfusion**

La leptine utilisée est murine, sa concentration varie dans les différents groupes afin de voir si l'effet qu'elle produit éventuellement, varie selon la concentration.

- Pas de leptine : témoin
- Leptine murine à 1 ng/ml
- Leptine murine à 5 ng/ml
- Leptine murine à 20 ng/ml

A partir d'une solution à 200 ng de leptine/ml

Leptine à 1 ng/ml : 0,5 ml de solution à 200 ng /ml et porter à 100 ml avec TCM199.

Leptine à 5 ng/ml : 2,5 ml de solution à 200 ng/ml et porter à 100 ml avec TCM199.

Leptine à 20 ng/ml : 10 ml de solution à 200 ng/ml et porter à 100 ml avec TCM199.

#### **B. Préparation de la solution de LH pour la périfusion**

La LH utilisée est de la LH ovine ultrapurifiée et doit être à une concentration à 10 ng/ml.

A partir d'une solution à 500 ng de LH/100µl, soit 5000 ng de LH/ml

LH à 10 ng/ml : 200µl de solution à 500 ng/100µl et porter à 100 ml avec TCM199.

#### **C. Préparation de la solution de FSH pour la périfusion**

La FSH utilisée est de la FSH ovine ultrapurifiée et doit être à une concentration 15 ng/ml.

A partir d'une solution à 300 ng de FSH/ml

FSH à 15 ng/ml : 12,5 ml de solution à 300 ng/ml et porter à 250 ml avec TCM199.

#### **1.4.2. Stimulations selon le modèle 2**

Sur 24 follicules périfusés :

Follicules	1 → 6	7 → 12	13 → 18	19 → 24
Leptine	0 ng/ml		5 ng/ml	
LH	10 ng/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml
FSH	15 ng/ml	150 ng/ml	15 ng/ml	150 ng/ml

#### **A. Préparation des solutions de leptine pour la périfusion**

La leptine utilisée est toujours murine.

- Pas de leptine : témoin
- Leptine murine à 5 ng/ml

A partir d'une solution à 200 ng de leptine/ml

Leptine à 5 ng/ml : 2,5 ml de solution à 200 ng/ml et porter à 100 ml avec TCM199.

#### **B. Préparation de la solution de LH pour la périfusion**

La LH utilisée est de la LH porcine purifiée, elle est identique à celle utilisée pour les expériences de superovulation chez la brebis.

A partir d'une solution à 1000 µg de LH/ml, soit 1 000 000 ng de LH/ml

LH à 10 ng/ml : 1 µl de solution à 1 000 000 ng/ml et porter à 100 ml avec TCM199.

LH à 100 ng/ml : 10 µl de solution à 1 000 000 ng/ml et porter à 100 ml avec TCM199.

#### **C. Préparation de la solution de FSH pour la périfusion**

La FSH utilisée est de la FSH porcine purifiée, elle est identique à celle utilisée pour les expériences de superovulation chez la brebis.

N.B. : la FSH est en unité UA, ce qui correspond à 10 µg.

A partir d'une solution à 100 µg de FSH/ml, soit 100 000 ng de FSH/ml

FSH à 15 ng/ml : 37,5 µl de solution à 100 000 ng/ml et porter à 250 ml avec TCM199.

FSH à 150 ng/ml : 375 µl de solution à 100 000 ng/ml et porter à 250 ml avec TCM199.

### 1.4.3. Stimulations selon le modèle 3

Sur 24 follicules périfusés :

Follicules	1 → 6	7 → 12	13 → 18	19 → 24
Leptine	0 ng/ml	0,5 ng/ml	5 ng/ml	50 ng/ml
LH	10 ng/ml			
FSH	15 ng/ml			

#### A. Préparation des solutions de leptine pour la périfusion

La leptine utilisée est toujours murine.

- Pas de leptine : témoin
- Leptine murine à 0,5 ng/ml
- Leptine murine à 5 ng/ml
- Leptine murine à 50 ng/ml

A partir d'une solution à 200 ng de leptine/ml

Leptine à 0,5 ng/ml : 0,25 ml de solution à 200 ng /ml et porter à 100 ml avec TCM199.

Leptine à 5 ng/ml : 2,5 ml de solution à 200 ng/ml et porter à 100 ml avec TCM199.

Leptine à 50 ng/ml : 25 ml de solution à 200 ng/ml et porter à 100 ml avec TCM199.

#### B. Préparation de la solution de LH pour la périfusion

La LH utilisée est de la LH porcine purifiée, elle est identique à celle utilisée pour les expériences de superovulation chez la brebis.

A partir d'une solution à 1000 µg de LH/ml, soit 1 000 000 ng de LH/ml

LH à 10 ng/ml : 1 µl de solution à 1 000 000 ng/ ml et porter à 100 ml avec TCM199.

#### C. Préparation de la solution de FSH pour la périfusion

La FSH utilisée est de la FSH porcine purifiée, elle est identique à celle utilisée pour les expériences de superovulation chez la brebis.

A partir d'une solution à 100 µg de FSH/ml, soit 100 000 ng de FSH/ml

FSH à 15 ng/ml : 37,5 µl de solution à 100 000 ng/ml et porter à 250 ml avec TCM199.

## 2. Dosages hormonaux par R.I.A. (Radio Immuno Assays)

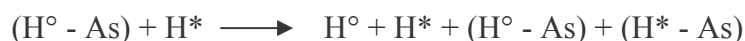
### 2.1 Principe

Le dosage radio-immunologique est basé sur la compétition entre une quantité déterminée d'hormone marquée par la fixation d'un ou plusieurs atomes radioactifs ( $I^{125}$ ,  $H^3$ ) et une quantité variable et inconnue de la même hormone se trouvant dans l'échantillon à analyser, vis-à-vis d'anti-sérum (As) qui leur est spécifique.

L'hormone « froide » ( $H^\circ$ ) peut se lier à l'anti-sérum spécifique et la réaction peut s'écrire de la manière suivante :



En ajoutant à ce système l'hormone marquée, on obtient une nouvelle équation :



La quantité d'hormone marquée ( $H^*$ ) fixée aux anticorps est d'autant plus faible que celle de l'hormone « froide » ( $H^\circ$ ) contenue dans l'échantillon sera élevée, et inversement.

On peut calculer la quantité de  $H^\circ$ , en séparant  $H^*$  liée à l'anti-sérum de  $H^*$  libre, par analyse de la radioactivité de l'une de ces deux fractions. On prend comme référence, une courbe standard effectuée dans les mêmes conditions avec des quantités connues et croissantes d' $H^\circ$ .

### 2.2 Appareillage

La mesure de la radioactivité  $\gamma$  ( $I^{125}$ ) est réalisée sur le compteur GammaMaster LKB Wallac à passeur d'échantillons, avec un temps de comptage fixé à 60 secondes/échantillon.

### 2.3 Dosage de l'oestradiol ( $E_2$ )

Pour le dosage de l'oestradiol, on utilise un kit : « BIOSOURCE E2-RIA-CT »

#### 2.3.1. Principe

Une quantité fixe de oestradiol marqué avec  $^{125}I$  entre en compétition avec l'oestradiol qui doit être mesuré et qui est présent dans l'échantillon ou dans le standard. L'oestradiol marqué et celui à mesurer doivent se fixer aux sites d'anticorps présents en nombre fixe et immobilisés sur les parois des tubes de polystyrène (tubes coatés). Après 3 heures d'incubation à température ambiante, une étape d'aspiration stoppe la réaction de compétition

et sépare la fraction liée de la fraction libre. Les tubes sont ensuite lavés avec une solution de lavage et ensuite aspirés. Une courbe standard est déterminée et les concentrations en oestradiol de l'échantillon sont déterminées par interpolation des doses de cette courbe standard.

### **2.3.2. Technique**

- Prélever 100 µl de chaque échantillon et les distribuer dans leurs tubes respectifs coatés avec des anticorps.
- Distribuer 1000 µl de E<sub>2</sub> marquée à l'<sup>125</sup>Iodine dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps (2 TC et 3 BG) pour la détermination de l'activité totale.
- Agiter chaque portoir afin d'éliminer les bulles d'air éventuelles.
- Incuber pendant 3 heures à 37°C.
- Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
- Laver les tubes avec 3 ml de solution de lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer.
- Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

## **2.4 Dosage de la progestérone (P<sub>4</sub>)**

Pour le dosage de la progestérone, on utilise un kit : « BIOSOURCE PROG-RIA-CT »

### **2.4.1. Principe**

Une quantité fixe de progestérone marquée avec <sup>125</sup>I entre en compétition avec la progestérone qui doit être mesurée et qui est présente dans l'échantillon ou dans le standard. La progestérone marquée et celle à mesurer doivent se fixer aux sites d'anticorps présents en nombre fixe et immobilisés sur les parois des tubes de polystyrène (tubes coatés). Après 3 heures d'incubation à température ambiante, une étape d'aspiration stoppe la réaction de compétition et sépare la fraction liée de la fraction libre. Les tubes sont ensuite lavés avec une solution de lavage et ensuite aspirés. Une courbe standard est déterminée et les concentrations en progestérone de l'échantillon sont déterminées par interpolation des doses de cette courbe standard.

### **2.4.2. Technique**

- Prélever 50µl de chaque échantillon et les distribuer dans leurs tubes respectifs coatés avec des anticorps.
- Distribuer 500 µl de progestérone marquée avec I<sup>125</sup> dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps (2 TC et 3 BG) pour la détermination de l'activité totale.
- Agiter chaque portoir afin d'éliminer les bulles d'air éventuelles.
- Incuber pendant 3 heures à 37°C.
- Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
- Laver les tubes avec 3 ml de solution de lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer.
- Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

N.B. : Pour les premières expériences, la courbe standard était réalisée avec les produits du kit mais par la suite, nous l'avons faite dans du TCM199 afin de garder le même milieu aussi bien pour les échantillons que pour la courbe standard.

## 2.5 Calculs des résultats

La radioactivité de la fraction liée peut être déterminée selon cette équation :

$$A = A_0 \frac{C_m}{C_m + C_f} + BG$$

A : radioactivité de la fraction liée (en cpm) pour une certaine concentration en hormone froide

A<sub>0</sub> : radioactivité maximale de la fraction liée (en cpm), c'est-à-dire pour C<sub>f</sub> = 0

BG : radioactivité non spécifique (Background)

C<sub>m</sub> = H\* : concentration en hormone marquée

C<sub>f</sub> : concentration en hormone froide

Cette équation permet de transformer les données obtenues en cpm en concentrations hormonales (ng/ml).

Par transformation de cette formule :

$$C_f = H^* \times ((A_0 / (A - BG)) - 1)$$

La mesure des paramètres de cette formule (A<sub>0</sub>, C<sub>m</sub> et BG) est réalisée par un fitting de la courbe grâce au logiciel MATLAB.

## 2.6. Analyses statistiques

A partir des résultats obtenus, nous allons réaliser des analyses statistiques, et plus particulièrement des analyses de variance afin de comparer les moyennes.

Ces analyses de variance vont nous permettre de voir si la différence entre ces moyennes est significative (P<0,05) ou non (P>à 0,05).

CHAPITRE IV:

RÉSULTATS

La technique de périfusion utilisée, mise au point au laboratoire, a été validée au vu des résultats concluants qu'elle fournissait (Noël *et al*, 1995). La stimulation des follicules avec de la FSH et de la LH induit une stéroïdogénèse dont la dynamique peut être suivie au fil des échantillons.

Sur l'entièreté des expériences réalisées, seule une a donné des résultats intéressants. Il est difficile d'élucider les raisons pour lesquelles une expérience fonctionne et d'autres pas néanmoins certaines hypothèses pourront être avancées compte tenu des résultats.

## 1. Stimulations selon le modèle 1

### 1.1. Résultats

Pour rappel, dans le modèle 1, les follicules étaient périfusés pendant une heure avec de la leptine murine à différentes concentrations (0, 1, 5 et 20 ng/ml). La stimulation par la LH et la FSH était réalisée ensuite.

Les différentes concentrations de leptine étaient appliquées sur six follicules (les expériences se réalisaient sur 24 follicules au total).

Tableau 1 : caractéristiques des follicules disséqués en vue de la mise en culture lors de la stimulation de type 1.

Numéro de l'animal	Numéro du follicule	Diamètre du follicule (mm)	Poids du follicule (g)	Remarques
1	1	7	0,135	Gestante
	2	4	0,047	
	3	3	0,058	
	4	3	0,046	
2	1	3	0,037	
3	1	3	0,033	
4	1	7	0,142	Gestante
	2	3	0,102	
5	1	6	0,147	Gestante
	2	3	0,045	
	3	3	0,045	
6	1	6	0,095	Gestante
	2	4	0,056	
	3	3	0,032	
	4	3	0,036	
7	1	5	0,097	Gestante
	2	6	0,102	
	3	3	0,050	
	4	4	0,03	
8	1	4	0,051	Gestante
	2	4	0,070	
9	1	4	0,067	
	2	4	0,051	

N.B. : chez la brebis, un follicule mesurant moins de 4 mm de diamètre est considéré comme un petit follicule, entre 4 et 6 mm, un follicule moyen et au-delà de 6 mm est considéré comme un grand follicule (de taille préovulatoire).



### Rappel :

Le programme de périfusion est établi comme suit :

0h00 : Mise en culture des follicules dans 500  $\mu$ l de TCM199 à 37°C

0h00-1h00 : TCM199 H1, H2

1h00-2h00 : TCM199 + Leptine H3, H4

2h00-3h00 : TCM199 H5, H6

3h00-3h20 : TCM199 + LH H7

3h20-3h30 : TCM199

3h30-4h30 : TCM199 + FSH H8, H9

4h30-7h30 : TCM199 H10 à H15

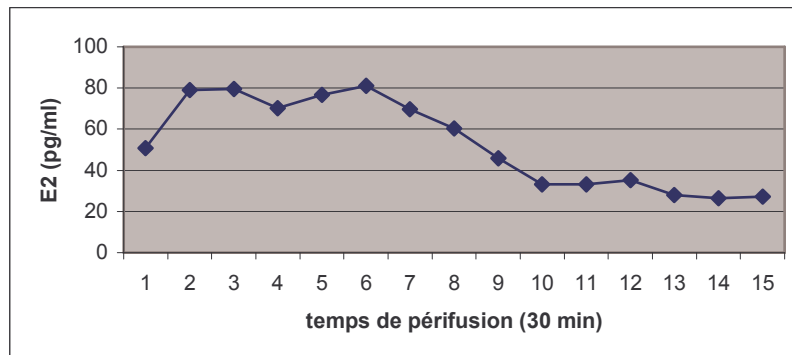
Chaque H correspond à 30 minutes, c'est le délai que l'on laisse entre chaque récolte.

### **A. Sécrétion d'E<sub>2</sub> en fonction du traitement à la leptine**

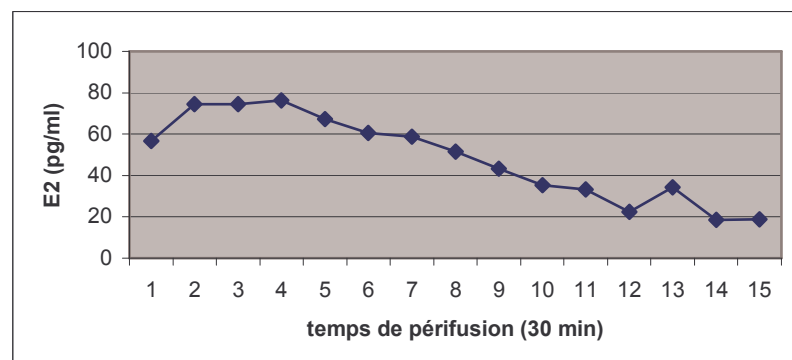
Les tracés des sécrétions moyennes ont été établis pour les 6 follicules de chaque groupe (figures 22 à 25 pour, respectivement les groupes de follicules recevant 0, 1, 5 et 20 ng/ml de leptine) montrent une évolution comparable.

Celle-ci peut être apparentée à une diffusion passive des stéroïdes du fluide folliculaire.

On n'y remarque aucune réponse ni à la leptine ni aux hormones gonadotropes.



**Figure 22 :** Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe n'ayant pas reçu de leptine (0 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.



**Figure 23 :** Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (1 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

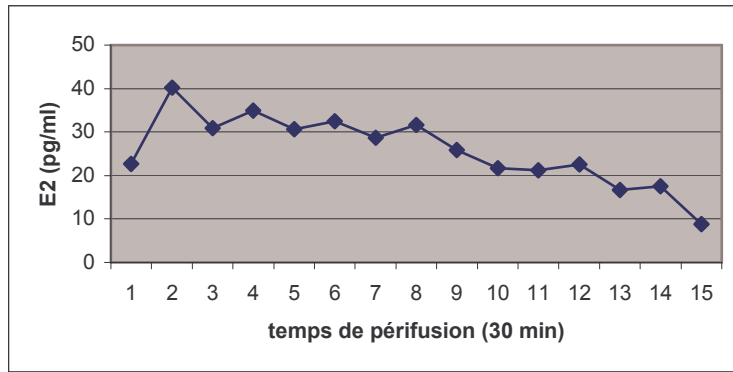


Figure 24 : Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (5 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

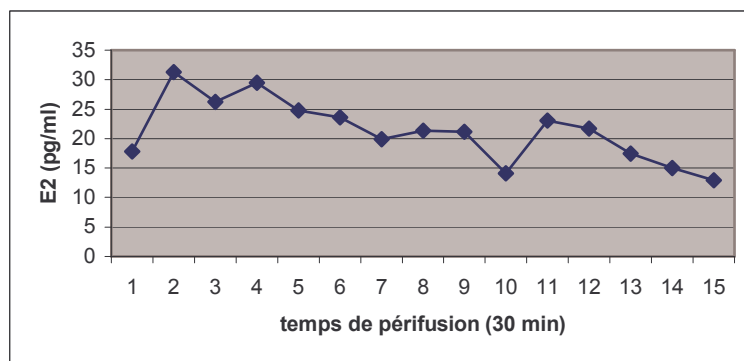


Figure 25 : Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (20 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

## B. Sécrétion de P<sub>4</sub> en fonction du traitement à la leptine

Les tracés enregistrés pour la P<sub>4</sub> montrent un profil semblable à ceux de l'E<sub>2</sub> (Figures 26 à 29).

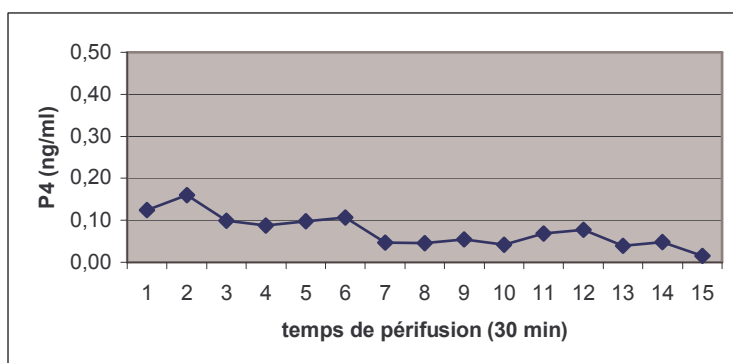


Figure 26 : Sécrétion de P<sub>4</sub> pour le groupe n'ayant pas reçu de leptine (0 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

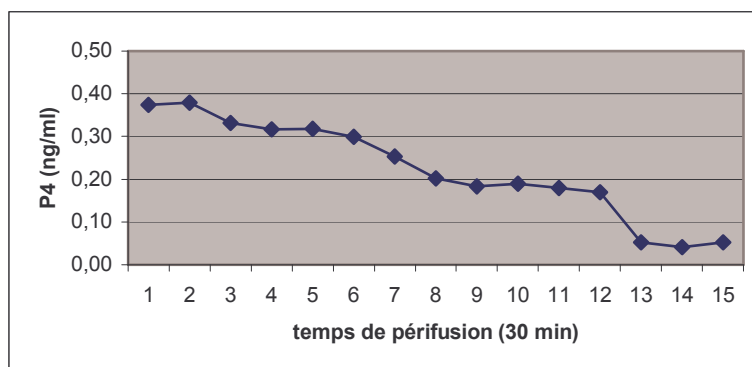


Figure 27 : Sécrétion de P<sub>4</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (1 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

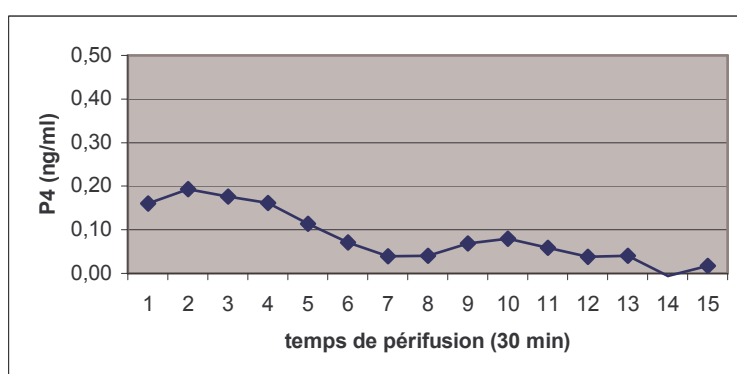


Figure 28 : Sécrétion de P<sub>4</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (5 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

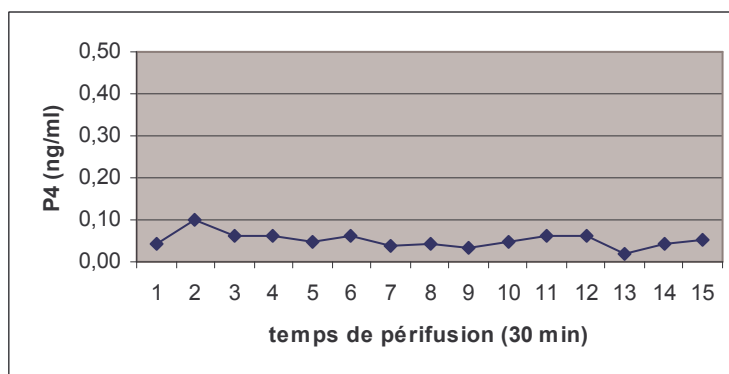


Figure 29 : Sécrétion de P<sub>4</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (20 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

## 1.2. Discussion

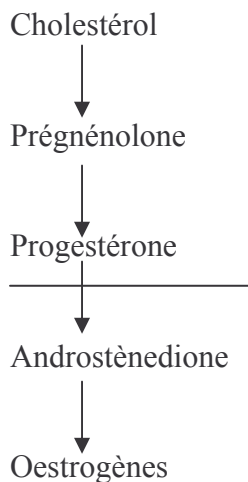
Pour tous les follicules, traités avec ou sans leptine, on remarque une augmentation de la sécrétion juste au début de la périfusion. Par la suite, on observe une régression progressive jusqu'à la fin de l'expérience, le follicule « se vide ».

Pour justifier ces résultats, on pourrait émettre comme hypothèses que :

- les ovaires de brebis n'ont pas supporté le trajet.
- la stimulation LH-FSH est non efficace. Pour cette expérience, nous avons utilisé de la LH et FSH ovines ultrapurifiées envoyées auparavant au laboratoire, celles-ci étaient peut-être trop âgées, c'est pourquoi pour les expériences suivantes, nous avons pris des hormones porcines purifiées récentes venant du centre de Faulx-les-Tombes.
- les brebis étant quasiment toutes gestantes, les expériences n'ont rien donné.
- les follicules sont atrétiques et donc ne réagissent pas aux traitements administrés.

N.B. : de façon schématique, (Robel, 1991)

Il est admis de considérer comme atrétique un follicule dont la sécrétion de  $P_4$  est supérieure à celle d' $E_2$ . Des études antérieures du laboratoire ont en effet mis en relation le blocage de l'activité aromatisation et la proportion de cellules présentant un noyau pycnotique.



S'il y a atrésie du follicule, il y a un blocage à ce stade de formation des stéroïdes : seule la progestérone est synthétisée et donc le niveau de  $P_4$  augmente.

Lors de cette expérience, les taux de  $P_4$  sont supérieurs à ceux d' $E_2$ , les follicules sont donc bien entrés en atrésie. Il est difficile de savoir si cette atrésie est naturelle (physiologique) ou plutôt due à des problèmes de transport, de conservation des ovaires et de dissection des follicules.

## 2. Stimulations selon le modèle 2

### 2.1. Résultats

Pour rappel, dans le modèle 2, les follicules étaient périfusés pendant une heure avec de la leptine murine à deux concentrations différentes (0 et 5 ng/ml). La stimulation par la LH et la FSH était réalisée ensuite également à deux concentrations différentes respectivement 10 et 100 ng/ml de LH et 15 et 150 ng/ml de FSH.

Nous disposions donc de quatre groupes de 6 follicules.

Tableau 2 : caractéristiques des follicules disséqués en vue de la mise en culture lors de la stimulation de type 2.

Numéro de l'animal	Numéro du follicule	Diamètre du follicule (mm)	Poids du follicule (g)	Remarques
1	1	5	0,075	
2	1	5	0,062	*
	2	5	0,059	*
3	1	10	0,354	
5	1	9	0,244	
6	1	7	0,130	
	2	6	0,094	
8	1	6	0,106	
10	1	8	0,205	
	2	7	0,130	
	3	6	0,116	
11	1	4	0,041	*
	2	4	0,026	*
	3	4	0,026	*
	4	3	0,024	*
	5	4	0,023	*
12	1	7	0,127	
	2	6	0,084	
13	1	8	0,137	
14	1	6	0,126	
	2	6	0,063	
15	1	6	0,093	
	2	4	0,057	*
	3	4	0,039	*
16	1	6	0,081	
	2	4	0,044	
17	1	6	0,143	
	2	5	0,108	*
18	1	6	0,105	
19	1	6	0,106	
	2	5	0,078	
	3	5	0,068	
20	1	5	0,078	
	2	5	0,078	

\* = éliminé de la sélection car trop petit ou d'aspect atrétique.

### A. Sécrétion d'E<sub>2</sub> en fonction du traitement à la leptine

La sécrétion moyenne d'E<sub>2</sub> en fonction des 4 traitements différents est représentée par les figures 30 à 33. Pour éliminer un effet éventuel de la taille des follicules sur le niveau d'émission, les valeurs sont exprimées par unité de surface des follicules. En effet, au cours de sa croissance, le follicule subit une augmentation importante du fluide folliculaire et de sa surface mais le nombre d'assises cellulaires de la thèque et de la granulosa reste plus ou moins constant.

Chaque valeur de concentration stéroïdienne a été divisée par la surface du follicule correspondant afin d'obtenir une échelle quasiment similaire pour pouvoir comparer les sécrétions stéroïdiennes des follicules.

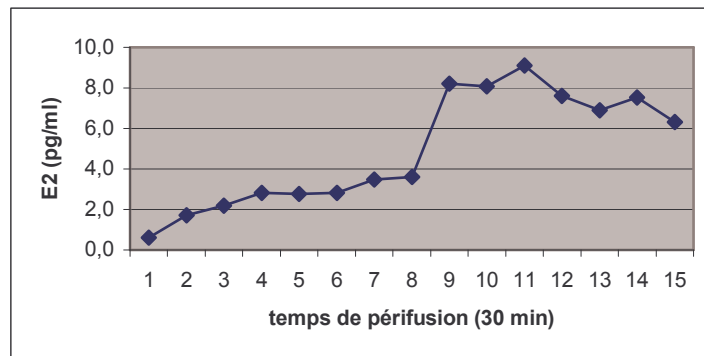


Figure 30 : Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe n'ayant pas reçu de leptine (0 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

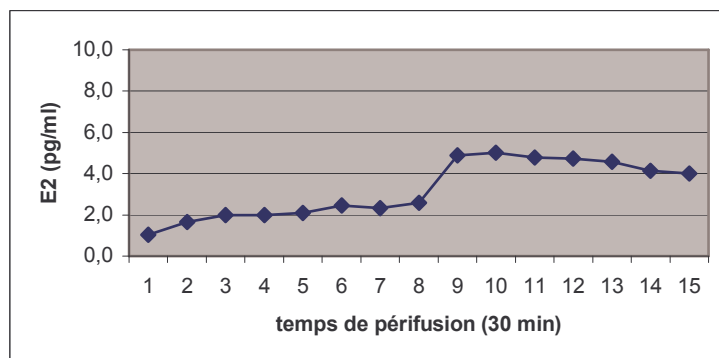


Figure31 : Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe n'ayant pas reçu de leptine (0 ng/ml), 100 ng/ml de LH et 150 ng/ml de FSH.

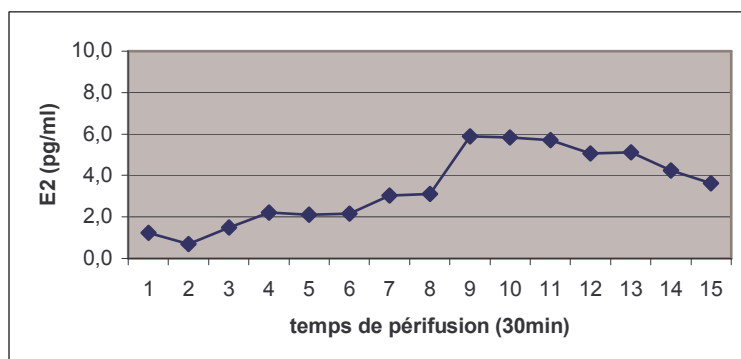


Figure 32 : Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (5 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

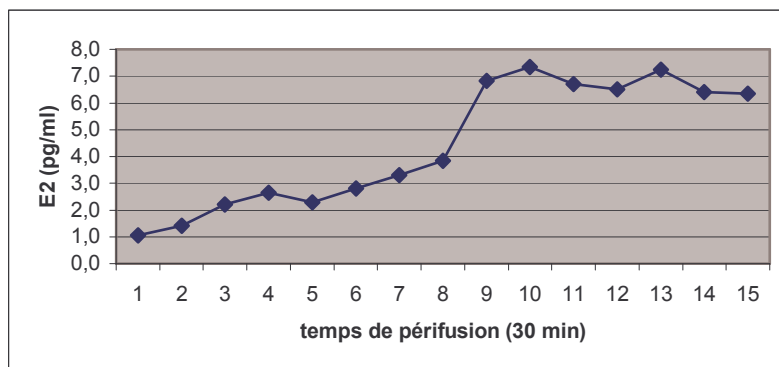


Figure 33 : Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (5 ng/ml), 100 ng/ml de LH et 150 ng/ml de FSH.

Sur tous les graphes, le taux d'E<sub>2</sub> augmente progressivement jusqu'au temps 8. Suite à la stimulation gonadotrope, les teneurs augmentent rapidement puis restent élevées malgré une lente diminution.

#### **B. Sécrétion de P<sub>4</sub> en fonction du traitement à la leptine**

Comme pour l'E<sub>2</sub>, le profil de sécrétion de la P<sub>4</sub> est présenté sur les figures 34 à 37 en concentration rapportée à l'unité de surface du follicule.

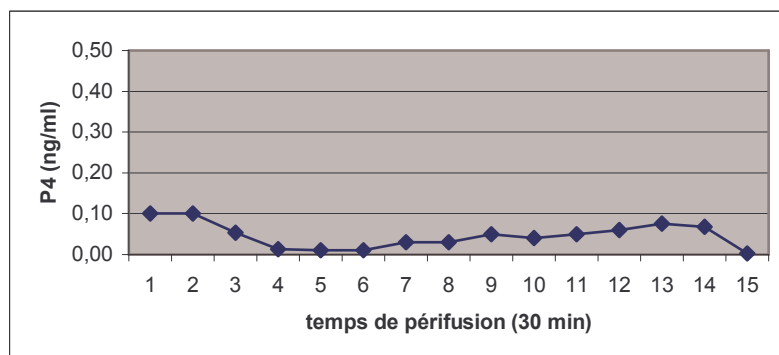


Figure 34 : Sécrétion de P<sub>4</sub> pour le groupe n'ayant pas reçu de leptine (0 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

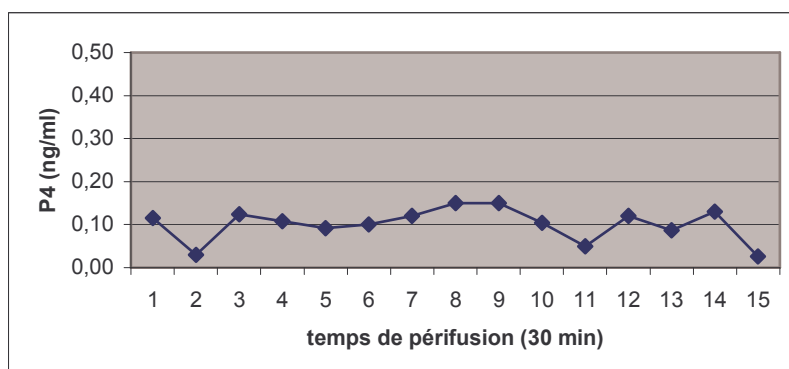


Figure 35 : Sécrétion de P<sub>4</sub> pour le groupe n'ayant pas reçu de leptine (0 ng/ml), 100 ng/ml de LH et 150 ng/ml de FSH.

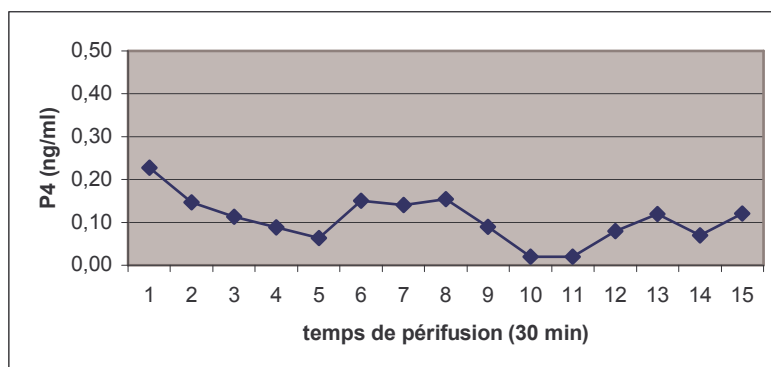


Figure 36 : Sécrétion de P<sub>4</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (5 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

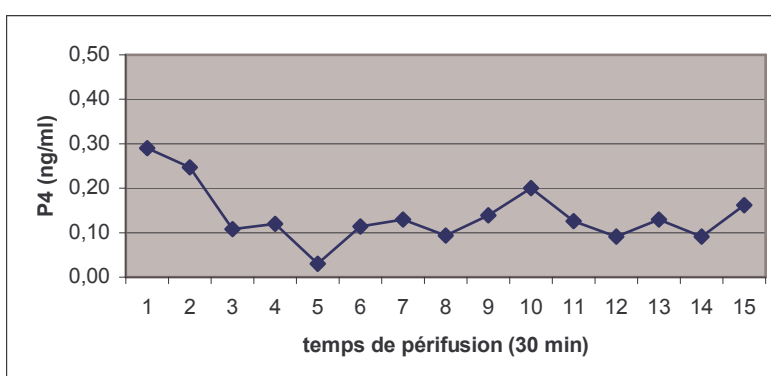


Figure 37 : Sécrétion de P<sub>4</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (5 ng/ml), 100 ng/ml de LH et 150 ng/ml de FSH.

La teneur des tubes de collecte du milieu de périfusion ne semble pas en relation avec les stimulations par la leptine ou les gonadotropines.



### C. Influence de la leptine sur la sécrétion de stéroïdes

Vu les résultats de cette expérience, on peut dès lors analyser l'influence de la leptine sur les stéroïdes.

#### Oestradiol

##### ➤ Effet direct de la leptine sur la sécrétion d'oestradiol

La première analyse consiste à comparer les taux d'E<sub>2</sub> mesurés aux temps H3 à H6, c'est-à-dire à partir de l'addition de leptine jusqu'avant la stimulation gonadotrope, entre les follicules ayant reçu 0 ou 5 ng de leptine par ml (figure 38).

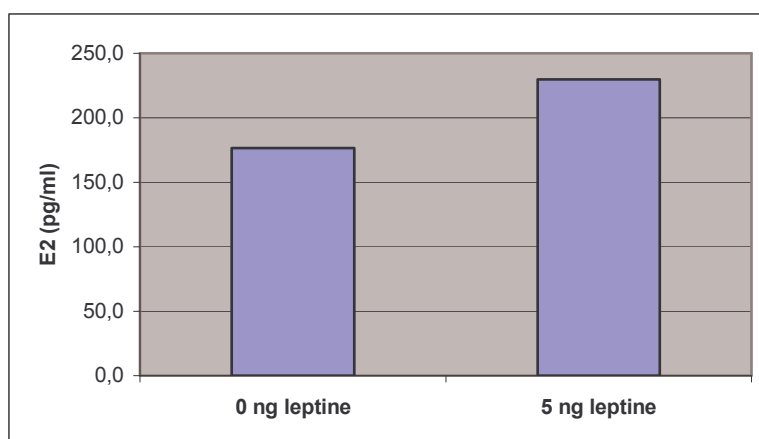


Figure 38 : Influence de la leptine sur la sécrétion d'oestradiol.

On remarque que, quand la leptine est présente, le taux d'E<sub>2</sub> sécrété est plus élevé mais statistiquement cette différence n'est pas significative ( $P > 0,05$ ).

Pour éliminer la grande variabilité des niveaux de sécrétion des follicules, bien que le profil reste semblable, une analyse a été réalisée uniquement avec les follicules traités à la leptine. Nous avons comparé les niveaux de production avant (H1-H2) et pendant (H3-H4) l'addition de leptine au milieu de perfusion (figure 39).

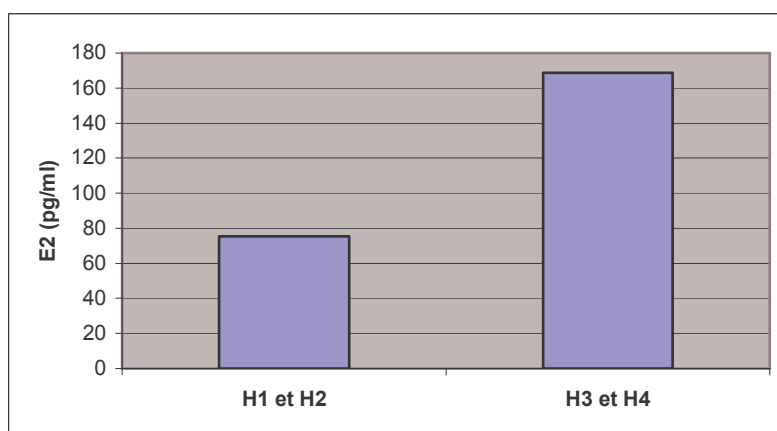


Figure 39 : Influence de la leptine sur la sécrétion d'oestradiol pour des follicules traités avec de la leptine.

On observe que le taux d'E<sub>2</sub> est plus élevé avec leptine. Statistiquement, cette différence est significative (P<0,05).

La même étude appliquée aux follicules n'ayant pas reçu de leptine ne montre pas de différence significative entre les taux d'E<sub>2</sub> mesurés aux temps H1-H2 par rapport aux H3-H4.

➤ **Effet direct de la leptine sur la sécrétion d'oestradiol par de petits, moyens et grands follicules**

Selon la littérature, la production d'E<sub>2</sub> *in vivo* est principalement le fait des gros follicules. D'autre part, les récepteurs à la leptine ne seraient pas présents en quantités identiques sur les cellules de follicules de différentes tailles.

Il est donc intéressant de voir si, dans nos stimulations *in vitro*, nous observons des différences entre classes de follicules.

Pour rappel, chez la brebis, un follicule mesurant moins de 4 mm de diamètre est un petit follicule, entre 4 et 6 mm, un follicule moyen et au-delà de 6 mm est considéré comme un grand follicule.

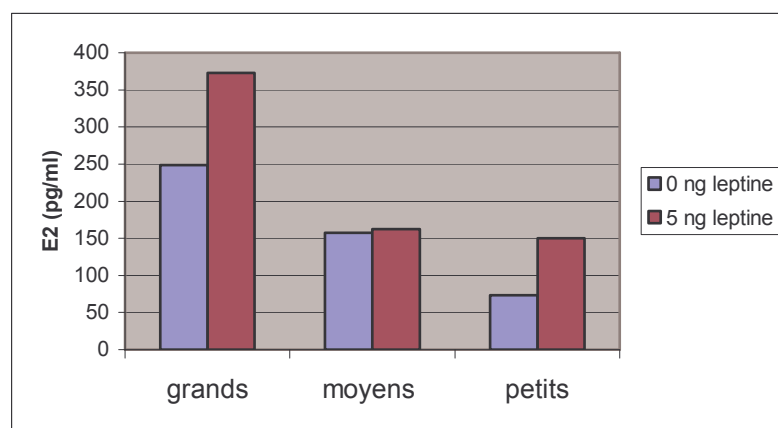


Figure 40 : Influence de la leptine sur la sécrétion d'E<sub>2</sub> par des grands, moyens et petits follicules.

Les résultats (figure 40) montrent dans les sécrétions en stéroïdes de follicules traités ou non à la leptine que:

- pour les petits follicules, le taux d'E<sub>2</sub> est plus élevé quand la leptine est présente et que statistiquement cette différence est hautement significative (P<0,01)
- pour les moyens follicules, le taux d'E<sub>2</sub> n'est pas plus élevé que la leptine soit présente ou absente et donc que la différence n'est pas significative (P> 0,05)
- pour les grands follicules, le taux d'E<sub>2</sub> est plus élevé quand la leptine est présente et que statistiquement cette différence est significative (P<0,05).

D'autre part, si on s'attache à comparer les taux d'E<sub>2</sub> obtenus en H3-H4 en fonction de la taille des follicules, on observe toujours des taux plus élevés en fonction de la taille mais aucune différence n'est significative.

➤ **Effet indirect de la leptine sur la réponse aux hormones gonadotropes**

La quantité d'E<sub>2</sub> sécrétée après avoir ajouté la LH et la FSH peut être influencée par le conditionnement à la leptine.

Pour l'étudier, nous avons comparé les valeurs après l'ajout de FSH (H8) pour les follicules avec et sans leptine.

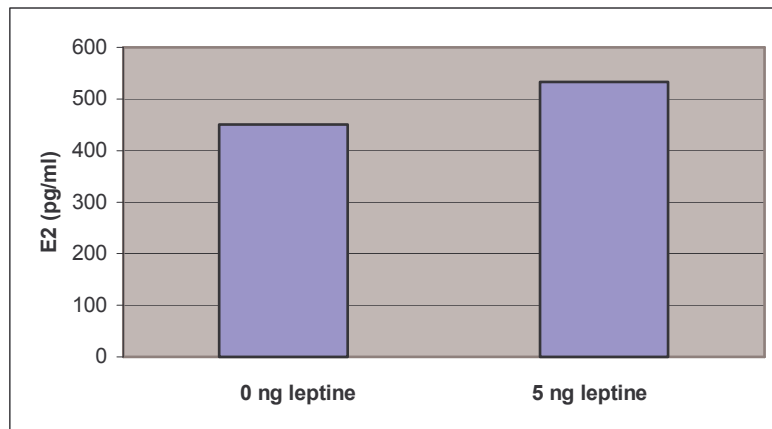


Figure 41 : Influence de la leptine sur la sécrétion d'E<sub>2</sub> en réponse aux hormones gonadotropes.

On remarque (figure 41) que, quand la leptine est présente, le taux d'E<sub>2</sub> sécrété est plus élevé mais statistiquement cette différence n'est pas significative ( $P > 0,05$ ).

Maintenant que nous avons analysé l'influence de la leptine sur la réponse aux hormones gonadotropes pour l'ensemble des follicules toutes tailles confondues, nous pouvons analyser son effet sur des groupes de follicules de tailles différentes.

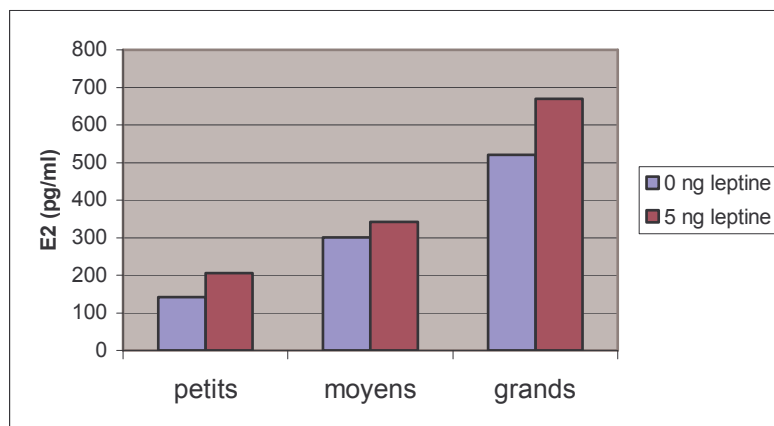


Figure 42 : Influence de la leptine sur la sécrétion d'E<sub>2</sub> en réponse aux hormones gonadotropes pour des follicules de tailles différentes.

Les résultats, présentés à la figure 42, montrent que l'influence de la leptine sur chaque classe de follicules est identique à son influence sur l'ensemble, à savoir une légère augmentation de la sécrétion, non significative ( $P > 0,05$ ). La leptine n'induit donc pas une meilleure réponse des follicules à une stimulation gonadotrope quelle que soit la taille du follicule.

Par contre, le graphique montre une production d'E<sub>2</sub> suite à la stimulation, qui varie en fonction de la taille du follicule. L'analyse statistique confirme cette observation. Les différences sont hautement significatives entre les classes de follicules ( $P < 0,01$ ) que ce soit avec ou sans préincubation avec de la leptine.

L'analyse des sécrétions avant (H1 à H8) par rapport à après la stimulation gonadotrope (H9 à H15) ne donne pas de différence significative si l'on travaille sur les concentrations brutes. L'augmentation des sécrétions est camouflée par la grande variabilité entre follicules à l'intérieur d'une classe et entre classes de follicules.

Nous avons dès lors corrigé les valeurs en fonction de la taille du follicule et démontré une augmentation très hautement significative des taux d'E<sub>2</sub> après la stimulation gonadotrope.

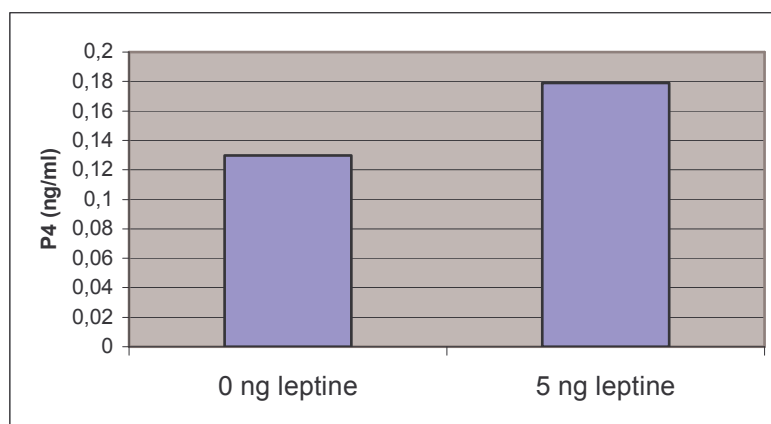
Afin d'étudier un effet de la leptine, nous avons comparé soit la différence entre les taux moyens enregistrés après et avant la stimulation, soit leur rapport, entre follicules conditionnés ou non avec de la leptine. Les valeurs sont proches et leurs différences toujours non significatives.

## **Progestérone**

### ➤ **Effet direct de la leptine sur la sécrétion de progestérone**

On peut s'intéresser également à l'influence directe de la leptine sur la sécrétion de progestérone.

Comme pour l'E<sub>2</sub>, les valeurs H3, H4, H5 et H6 qui correspondent aux valeurs situées entre l'ajout de leptine et l'ajout de LH sont comparées entre follicules traités et non traités à la leptine.



**Figure 43 :** Influence de la leptine sur la sécrétion de progestérone.

On remarque (figure 43) que, quand la leptine est présente, le taux de P<sub>4</sub> sécrété est plus élevé mais statistiquement cette différence n'est pas significative ( $P > 0,05$ ).

Maintenant on peut s'intéresser uniquement aux follicules traités avec leptine et regarder les variations au sein de ces follicules. On prend les temps H1 et H2 (sans leptine) et on les compare avec les temps H3 et H4 (avec leptine).

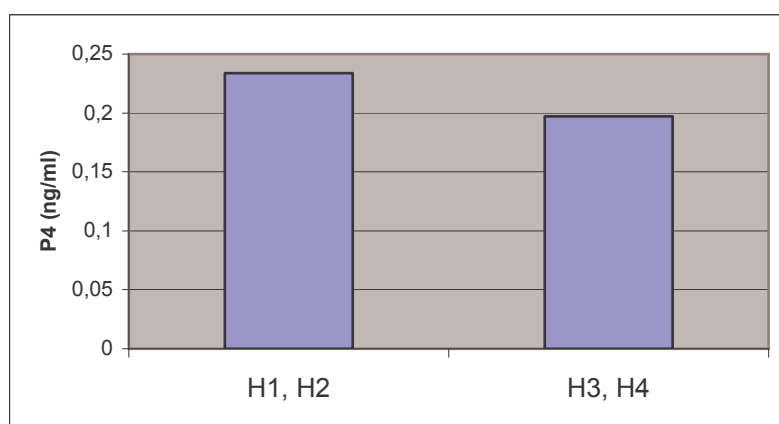


Figure 44 : Influence de la leptine sur la sécrétion de progestérone pour des follicules traités avec de la leptine.

On observe (figure 44) que le taux de P<sub>4</sub> est plus bas avec leptine. Statistiquement, cette différence n'est pas significative ( $P > 0,05$ ).

Une évolution semblable, et également non significative, est calculée pour les follicules non traités à la leptine.

➤ **Effet direct de la leptine sur la sécrétion de progestérone par de petits, moyens et grands follicules**

Comme pour l'E<sub>2</sub>, il est intéressant de distinguer les réponses en fonction de la taille des follicules (figure 45).

Nous avons donc dans un premier temps comparé les réponses directes à la leptine (tubes H3 à H6) entre de follicules recevant 0 ou 5 ng de leptine, ceci à l'intérieur des 3 classes de follicules.

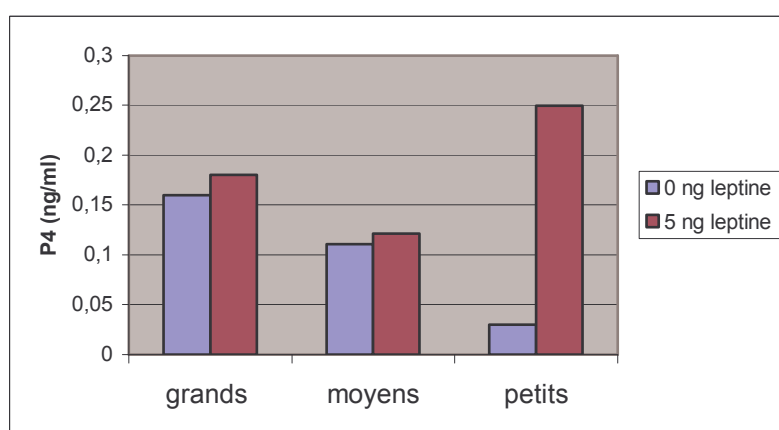


Figure 45 : Influence de la leptine sur la sécrétion de P<sub>4</sub> par des grands, moyens et petits follicules.

L'analyse statistique montre que les taux de P<sub>4</sub> ne sont significativement plus élevés, après addition de leptine, que chez les petits follicules ( $P < 0,05$ ).

Seuls les petits follicules répondent donc à une stimulation à la leptine en sécrétant plus de P<sub>4</sub>.

Ensuite, il nous a semblé intéressant de comparer les réponses à la leptine (H3-H4 des follicules recevant 5 ng de leptine) en fonction de la taille des follicules.

Le résultat est que plus le follicule est grand, moins il sécrète de  $P_4$ , mais aucune différence n'est significative, que ce soit en analysant les 3 classes ensemble ou en les comparant 2 par 2.

#### ➤ Effet indirect de la leptine sur la réponse aux hormones gonadotropes

La quantité de  $P_4$  sécrétée après avoir ajouté la LH et la FSH est estimée sur base des valeurs au-delà de l'ajout de FSH (H8). Si l'on compare les données avec et sans leptine, on remarque que, quand la leptine est présente, le taux de  $P_4$  sécrété est plus élevé ; statistiquement cette différence est hautement significative ( $P < 0,01$ ).

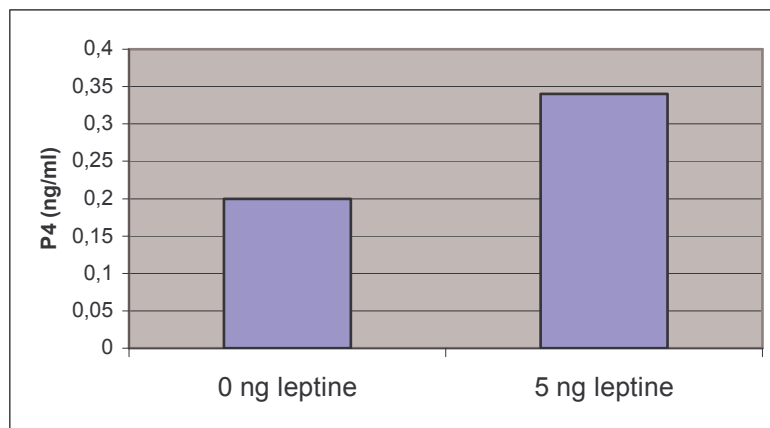


Figure 46 : Influence de la leptine sur la réponse aux hormones gonadotropes.

Maintenant que nous avons observé l'influence de la leptine sur la réponse aux hormones gonadotropes pour l'ensemble des follicules toutes tailles confondues, nous pouvons alors analyser son effet sur des classes de follicules de tailles différentes.

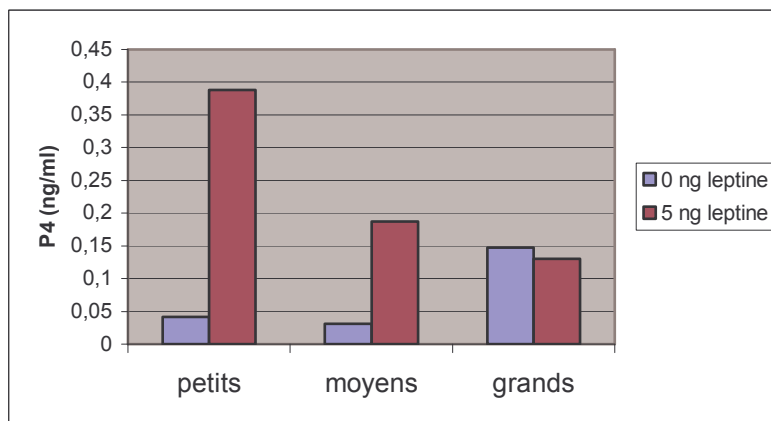


Figure 47 : Influence de la leptine sur la sécrétion de  $P_4$  en réponse aux hormones gonadotropes pour des follicules de tailles différentes.

On observe (figure 47) que :

- pour les petits follicules, le taux de  $P_4$  est plus élevé chez ceux qui ont été conditionnés à leptine ( $P < 0,05$ )
- pour les moyens follicules, le taux de  $P_4$  est également plus élevé quand la leptine a été administrée ( $P < 0,01$ )
- pour les grands follicules, la différence est non significative ( $P > 0,05$ ).

La comparaison des taux de sécrétion chez les follicules traités (5 ng leptine) en fonction des classes de taille montre que la réponse aux hormones gonadotropes diminue des petits aux grands follicules ( $P = 0,02$ ), mais lorsqu'on compare les classes 2 à 2, la différence n'est pas significative entre moyens follicules et grands follicules ( $P = 0,10$ ), est à la limite de signification entre petits et moyens follicules ( $P = 0,056$ ) et est significative entre des grands et petits follicules ( $P < 0,05$ ).

L'étude de la réponse des follicules en terme de sécrétion de  $P_4$  suite à la stimulation gonadotrope n'a montré aucune différence significative entre les taux mesurés après ou avant la stimulation, que ceux-ci soient exprimés en concentrations ou rapportés à l'unité de surface des follicules.

#### **D. Sécrétion de stéroïdes en fonction de la taille des follicules**

En dehors des effets de la leptine qui ont été analysés ci-dessus, l'activité intrinsèque des follicules en fonction de leurs classes de taille est un paramètre intéressant à analyser

Les résultats calculés sur la sécrétion moyenne tout au long de l'expérience (figure 48) montrent que pour l' $E_2$  les différences sont significatives, le niveau de sécrétion augmentant avec la taille des follicules.

Cette différence se maintient même si l'on corrige le niveau de sécrétion par rapport à la taille des follicules (par  $mm^2$  de surface de follicule). La sécrétion augmente en fonction de la taille ( $P < 0,01$ ). Cependant une analyse entre classes montre que le seuil de signification n'est pas atteint si l'on compare grands et moyens follicules ou moyens et petits follicules. Par contre, elle est hautement significative entre grands et petits follicules. ( $P = 0,0005$ ).

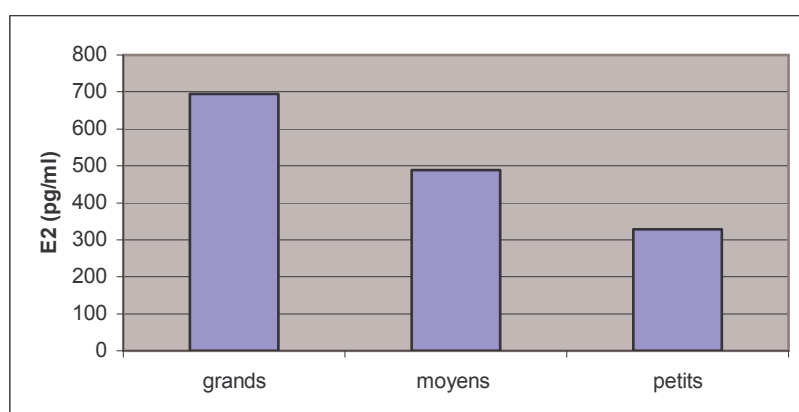


Figure 48 : Influence de la taille des follicules sur le taux de libération d' $E_2$ .

Pour la progestérone, les différences sont moins nettes (figure 49) et vont dans le sens de ce qui avait été observé pour les productions de  $P_4$  suite à l'addition de leptine (figure 45), à savoir que les petits follicules produisent plus de  $P_4$  que les moyens ( $P < 0,05$ ).

Les différences mesurées pour les 3 classes ensemble ou 2 par 2 sont non significatives pour les autres comparaisons.

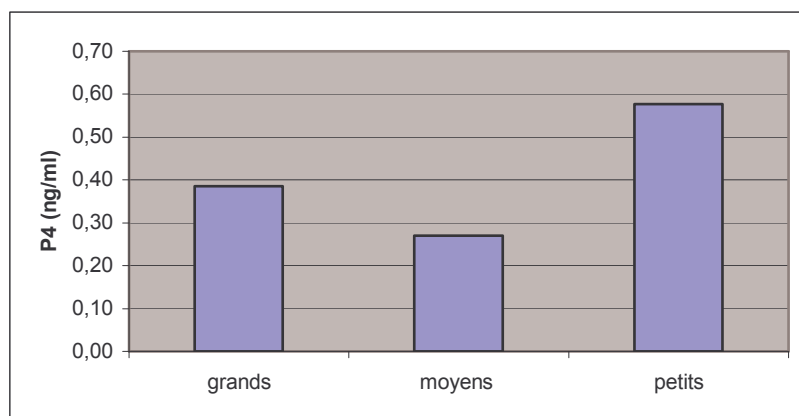


Figure 49 : Influence de la taille des follicules sur le taux de libération de  $P_4$ .

#### E. Comparaison entre les deux traitements gonadotropes

Dans cette expérience, nous avons augmenté les concentrations de la stimulation standardisée LH-FSH. Nous voulons voir s'il existe une différence entre les sécrétions stéroïdiennes de follicules traités avec doses classiques d'hormones gonadotropes et doses multipliées par 10.

On s'est basé d'une part sur la différence entre la moyenne des teneurs en  $E_2$  après et avant la stimulation standardisée LH-FSH et d'autre part sur le rapport entre les valeurs après et avant cette stimulation standardisée (figure 50).

Toutes les différences sont non significatives.

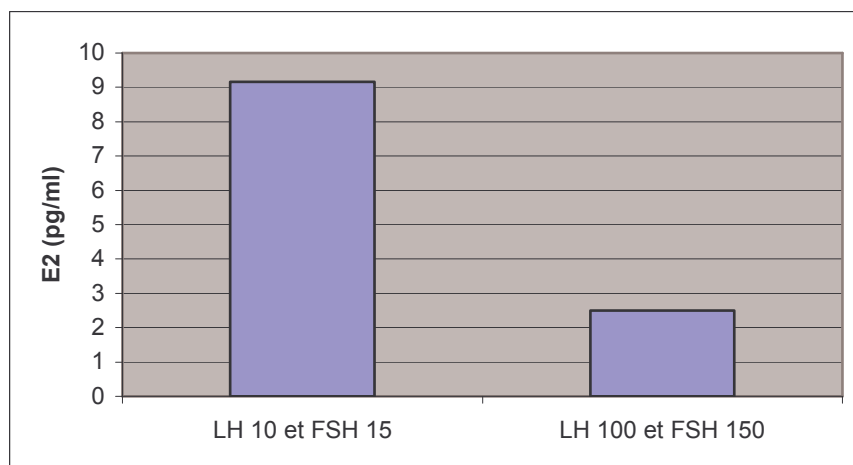


Figure 50 : Comparaison entre deux traitements gonadotropes



### 3. Stimulations selon le modèle 3

#### 3.1. Résultats

Pour rappel, dans le modèle 3, les follicules étaient périfusés pendant une heure avec de la leptine murine à différentes concentrations (0, 0,5, 5 et 50 ng/ml). La stimulation par la LH et la FSH était réalisée ensuite.

Les différentes concentrations de leptine étaient appliquées sur six follicules (les expériences se réalisaient sur 24 follicules au total).

Tableau 3 : caractéristiques des follicules disséqués en vue de la mise en culture lors de la stimulation de type 3.

Numéro de l'animal	Numéro du follicule	Diamètre du follicule (mm)	Poids du follicule (g)	Remarques
1	1	4	0,067	*
2	1	5	0,084	
4	1	5	0,06	*
	2	5	0,056	*
	3	6	0,105	
5	1	8	0,183	
6	1	5	0,087	
	2	6	0,127	
8	1	4	0,051	*
10	1	8	0,180	
11	1	8	0,171	
12	1	6	0,066	*
	2	7	0,142	
13	1	5	0,084	
	2	6	0,151	
	3	9	0,295	
14	1	11	0,489	
15	1	7	0,154	
	2	7	0,147	
16	1	5	0,07	
	2	6	0,093	
17	1	6	0,113	
	2	8	0,173	
18	1	5	0,076	
	2	5	0,063	*
	3	4	0,051	*
19	1	5	0,089	
20	1	14	0,827	
21	1	14	0,061	*
	2	5	0,125	
	3	7	0,213	
22	1	8	0,087	
	2	5	0,042	*

\* = éliminé de la sélection car trop petit ou d'aspect atrétique.

En ce qui concerne les sécrétions d'E<sub>2</sub> et de P<sub>4</sub> pour quasiment tous les follicules, traités avec ou sans leptine, on remarque (figures 47 à 54) une augmentation de la sécrétion dès le début de la périfusion. Par la suite, on observe une régression progressive jusqu'à la fin de l'expérience, le follicule « se vide ».

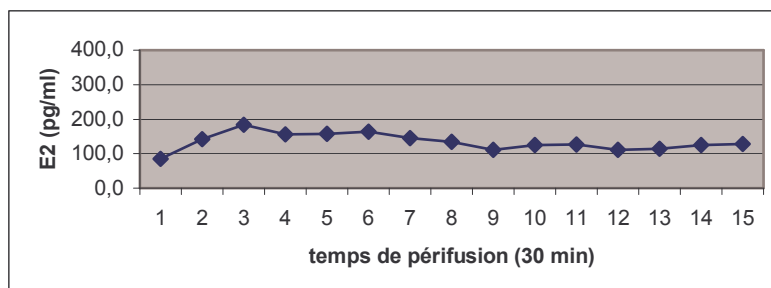


Figure 47 : Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe n'ayant pas reçu de leptine (0 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

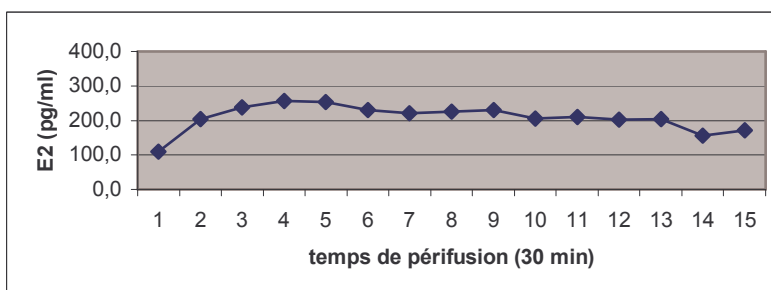


Figure 48 : Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe ayant reçu de leptine (0,5 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

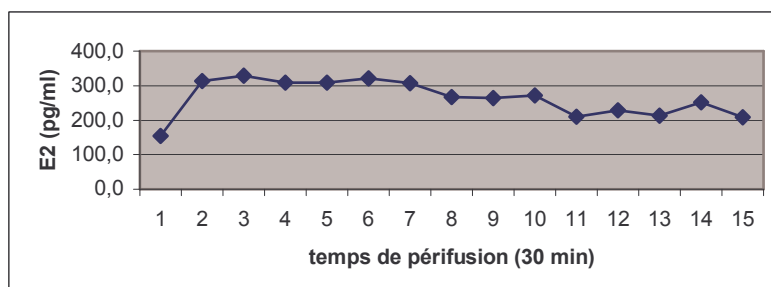


Figure 49 : Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (5 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

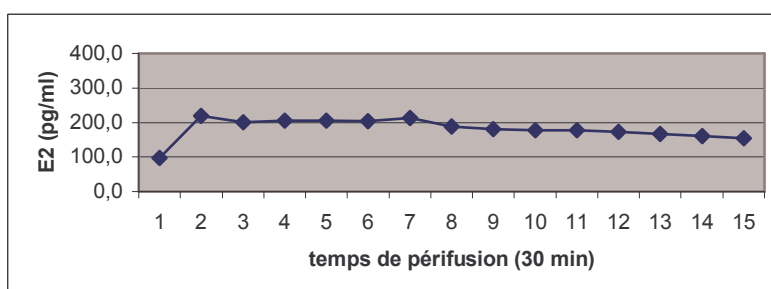


Figure 50 : Sécrétion d'E<sub>2</sub> pour le groupe ayant reçu de la leptine (50 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

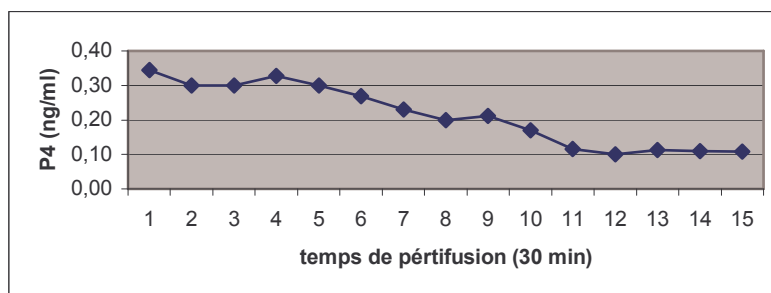


Figure 51 : Sécrétion de  $P_4$  pour le groupe n'ayant pas reçu de leptine (0 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

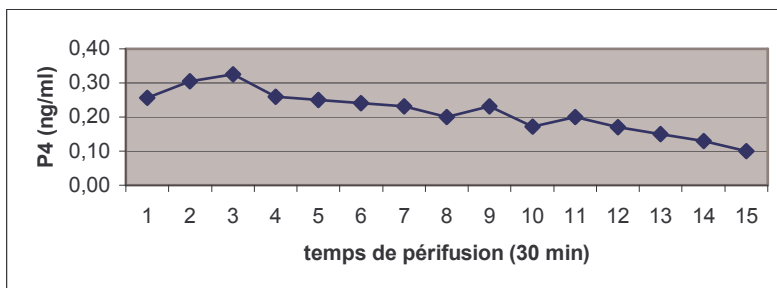


Figure 52 : Sécrétion de  $P_4$  pour le groupe ayant reçu de leptine (0,5 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

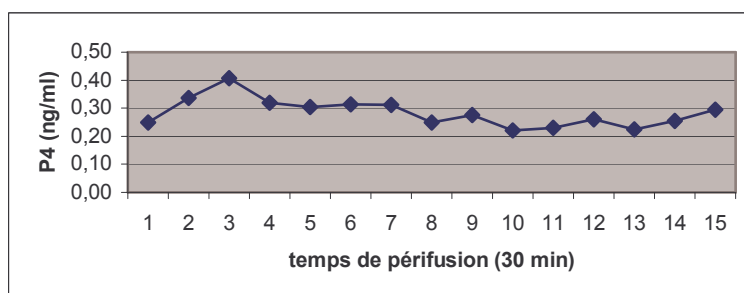


Figure 53 : Sécrétion de  $P_4$  pour le groupe ayant reçu de la leptine (5 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

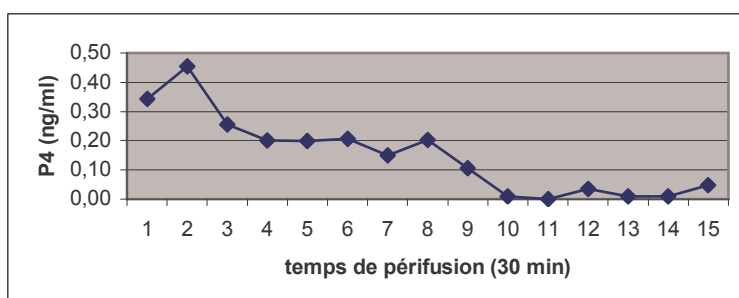


Figure 54 : Sécrétion de  $P_4$  pour le groupe ayant reçu de la leptine (50 ng/ml), 10 ng/ml de LH et 15 ng/ml de FSH.

### 3.2. Discussion

Nous obtenons des résultats identiques au modèle 1, on peut dès lors émettre les mêmes hypothèses afin de justifier l'échec de cette expérience.

- les ovaires de brebis n'ont pas supporté le trajet.
- les follicules ont été périfusés dans un laps de temps trop long.

L'idéal serait de périfuser les follicules directement dans les 2 ou 3 heures suivant l'abattage des brebis mais plusieurs facteurs empêchent cette réalisation : les abattoirs se trouvent à une heure du laboratoire, tous les moutons sont abattus, donc aussi bien des males que des femelles, il faut environ une heure et demie pour obtenir 20 ovaires de brebis, le temps de dissection est approximativement d'une heure, ensuite viennent les mesures de poids et de taille et enfin, la périfusion des follicules.

Le mieux serait donc de réduire ce temps tout en sachant que ce sont des facteurs difficilement modifiables.

- les follicules sont atrétiques et donc ne réagissent pas aux traitements administrés.

Selon l'hypothèse du laboratoire selon laquelle un follicule atrétique produit plus de  $P_4$  que de  $E_2$ , il apparaît en effet que beaucoup de follicules sont dans ce cas.

*CHAPITRE V:*  
*DISCUSSION*

## **1. Causes de l'échec de certaines expériences**

Sur toutes les expériences réalisées dans ce travail seule une, seule une a donné des résultats probants.

Les raisons pour lesquelles les autres expériences n'ont pas fonctionné restent non élucidées, cependant quelques hypothèses ont pu être émises :

- les brebis étaient gestantes
- les follicules étaient atrétiques ( $P_4 > E_2$ )  
Des études antérieures du laboratoire ont mis en relation le blocage de l'activité aromatase et la proportion de cellules présentant un noyau pycnotique.

Les raisons de cette atrésie peuvent être d'une part physiologique (pour quelques follicules) et d'autre part dues aux conditions de récolte (transport, dissection,...).

Nous allons donc discuter sur les effets de la leptine uniquement pour l'expérience 2.

## **2. Influence de la taille du follicule**

En ce qui concerne les sécrétions d'oestradiol, nous obtenons que les grands follicules sécrètent plus d' $E_2$  que les moyens et les petits, et cela même si les valeurs sont rapportées à l'unité de surface.

Les grands follicules sont plus actifs et plus matures au point de vue de la synthèse finale.

En ce qui concerne les sécrétions de progestérone, nous remarquons qu'elle est produite surtout par les petits follicules. Cela confirme bien qu'ils n'ont pas encore acquis tout l'équipement enzymatique nécessaire pour produire de l' $E_2$ .

D'où l'intérêt éventuel de comparer les différentes classes de follicules dans les analyses ultérieures.

Ces expériences, et les suivantes, confirme bien le fait que la granulosa ovarienne et les cellules de la thèque possèdent des récepteurs de haute affinité pour la leptine (Spicer *et al*, 1998).

## **3. Influence directe de la leptine sur les sécrétions stéroïdiennes**

En ce qui concerne l' $E_2$ , nous avons comparé :

- les sécrétions des follicules traités avec ou sans leptine : nous observons un effet significatif de la leptine sur quasiment toutes les classes de follicules.
- pour les follicules traités avec leptine, les sécrétions entre les classes de follicules : aucune différence n'est significative.
- toujours pour les follicules traités avec leptine, les sécrétions avant et après l'addition de leptine : la différence est significative, nous avons ensuite réalisé la même expérience avec des follicules non traités à la leptine : la différence est non significative.

On peut donc dire que la leptine possède la capacité de déclencher une sécrétion d'E<sub>2</sub> par des follicules *in vitro*, quelque soit sa taille, en dehors de toutes autres stimulations

On confirme donc que la leptine a des effets directs sur les cellules de la granulosa *in vitro* (Karlsson *et al*, 1997).

Selon Gregoraszcuk, la leptine a une dose de 2 ng/ml n'a pas d'effet sur la sécrétion d'oestradiol par des petits et moyens follicules mais diminue la sécrétion d'E<sub>2</sub> par des grands (Gregoraszcuk *et al*, 2002).

En ce qui concerne nos expériences, les résultats diffèrent.

En ce qui concerne la P<sub>4</sub>, nous avons comparé et constaté :

- les sécrétions des follicules traités avec ou sans leptine : nous observons un effet significatif de la leptine uniquement sur les petits follicules.
- pour les follicules traités avec leptine, les sécrétions entre les classes de follicules : la différence est non significative.
- pour les follicules traités avec ou sans leptine, les sécrétions avant et après l'addition de leptine : aucune différence n'est significative.

Nous pouvons dès lors émettre deux éventualités :

La première, la leptine ne peut stimuler que les petits follicules.

La seconde, la leptine stimule tous les follicules, mais les moyens et les grands qui sont plus aptes à produire de l'E<sub>2</sub> transforment la P<sub>4</sub> au fur et à mesure de sa synthèse.

Selon Gregoraszcuk, la leptine à une dose de 2 ng/ml n'a pas d'effet sur la sécrétion de progestérone par des petits et moyens follicules mais augmente largement la sécrétion de P<sub>4</sub> par des grands (Gregoraszcuk *et al*, 2002).

En ce qui concerne nos expériences, les résultats diffèrent.

De même, selon Spicer, les informations *in vitro* indiquent que la leptine pourrait jouer un rôle inhibiteur direct sur la fonction ovarienne en inhibant la stéroïdogenèse à la fois au niveau des cellules de la thèque et des cellules de la granulosa, conduisant ainsi à une diminution de la sécrétion d'oestradiol (Spicer *et al*, 2001).

Selon nos expériences, de ce que l'on a pu voir, la leptine favoriserait la sécrétion de stéroïdes.

#### **4. Influence indirecte de la leptine sur la réponse à LH-FSH**

En ce qui concerne l'E<sub>2</sub>, nous avons comparé et constaté :

- les sécrétions (après H8) avec et sans leptine : aucune différence significative quelque soit la taille du follicule.
- les sécrétions entre les classes de follicules : un effet hautement significatif quelque soit la comparaison, avec ou sans conditionnement à la leptine.
- les sécrétions avant et après l'ajout LH-FSH : effet non significatif quelque soit la taille du follicule et conditionné ou non avec de la leptine.

- pour les follicules traités avec ou sans leptine, soit la différence entre les taux moyens enregistrés avant et après la stimulation, soit leur rapport : aucune différence significative.

Selon Gregoraszczuk, il existe une action synergique des hormones gonadotropes avec la leptine sur la sécrétion d'œstradiol par des petits et moyens follicules (Gregoraszczuk *et al*, 2002).

En ce qui concerne nos expériences, les résultats diffèrent, nous n'obtenons pas de résultat significatif.

En ce qui concerne la  $P_4$ , nous avons comparé et constaté :

- les sécrétions avec ou sans leptine : nous observons, pour les petits et moyens follicules, une différence significative tandis qu'elle est non significative pour les grands.
- les sécrétions entre les classes de follicules : différence significative entre les grands et les petits follicules.
- les taux avant et après la stimulation LH-FSH, que ceux-ci soient exprimés en concentrations ou rapportés à l'unité de surface : aucune différence significative.

Selon Gregoraszczuk, il existe une action synergique des hormones gonadotropes avec la leptine sur la sécrétion de progestérone par des grands follicules (Gregoraszczuk *et al*, 2002).

En ce qui concerne nos expériences, les résultats diffèrent, nous n'obtenons pas de résultat significatif.

Nous pouvons donc dire que la stimulation gonadotrope a donné de bons résultats en terme d'augmentation de sécrétion d' $E_2$ , et aucune différence n'est enregistrée entre la stimulation forte et la stimulation standard pourtant 10 fois moindre.

Il est donc probable que tous les récepteurs soient saturés même avec la faible dose, de niveau physiologique.

La  $P_4$  n'a pas augmenté significativement, signe probable de sa métabolisation en œstrogènes.

Quelque soit la méthode utilisée pour tenter de mettre en évidence une influence de la leptine sur les réponses  $E_2$  ou  $P_4$  à la stimulation gonadotrope, la légère diminution des réponses d' $E_2$  a toujours été non significative.



CHAPITRE VI :

CONCLUSIONS ET  
PERSPECTIVES

En conclusion, le fait que la leptine soit susceptible d'induire par elle-même une sécrétion d'E<sub>2</sub> dans toutes les classes de follicules et de P<sub>4</sub> au moins chez les petits follicules montre que les cellules folliculaires synthétisent les récepteurs Ob.

Ces récepteurs sont présents sur la granulosa à tous les stades du follicule antral et sur la thèque au moins chez les petits follicules.

L'influence de la leptine sur la réponse stéroïdogène des follicules après stimulation gonadotrope est une tendance vers une réduction de la réponse, mais n'est pas significative.

Si l'on se place au niveau de l'influence de l'état corporel de la brebis sur sa fécondité, le rôle de la leptine, bien démontré, ne semble pas devoir jouer de manière significative sur l'activité sécrétoire des follicules en croissance terminale.

Ceci n'empêche pas qu'elle puisse avoir un effet sur la croissance elle-même ou sur le recrutement des petits follicules qui émergent de la croissance basale, ou sur le nombre de follicules qui subissent cette croissance basale.

Il serait intéressant de confirmer ces résultats par la mise au point d'une technique permettant de détecter ou de quantifier les récepteurs à la leptine sur les différents tissus folliculaires, soit par un système immunologique tourné contre ces récepteurs à la surface cellulaire, soit par une RT-PCR mettant en évidence l'expression du gène de ce récepteur.

Il serait utile aussi de refaire cet essai en améliorant les conditions de conservation des ovaires (et de leurs follicules) entre le moment de l'abattage et la mise en culture.

Puis, une étude devrait être réalisée avec ce système de périfusion très intéressant en utilisant des ovaires prélevés sur des brebis grosses ou maigres, en fin de flushing ou de période d'amaigrissement, en saison ou à contre-saison de reproduction puisque la leptine varie aussi avec la photopériode.

Ce travail n'a en fait consisté qu'en un débroussaillage de terrain et ouvre de nouvelles perspectives de recherches.

## REFERENCES

## BIBLIOGRAPHIQUES

- Brann D.W., Wade M.F., Dhandapani K.M., Mahesh V.B., Buchanan C.D. (2002)  
Leptin and reproduction.  
*Steroids* **67**, 95-104.
- Bruneau G., Vaisse C., Caraty A., Monget P. (1999)  
La leptine : un clé pour la reproduction.  
*Médecine/Sciences* **15**, 191-6.
- Caprio M., Fabbrini E., Isidori A.M., Aversa A., Fabbri A. (2001)  
Leptin in reproduction.  
*Trends in endocrinology & metabolism* **12** (2), 65-70.
- Chemineau P., Blanc M., Caraty A., Bruneau G., Monget P. (1999)  
Sous-nutrition, reproduction et système nerveux central chez les mammifères : rôle de la leptine.  
*INRA Prod Anim* **12**(3), 217-223.
- Chilliard Y., Bocquier F., Delavaud C., Faulconnier Y., Bonnet M., Guerre-Millo M., Martin P., Ferlay A. (1999)  
La leptine chez le ruminant. Facteurs de variation physiologiques et nutritionnels.  
*INRA Prod Anim* **12**(3), 225-237.
- Cunningham M.J., Clifton D.K., Steiner R.A. (1999)  
Leptin's actions on the reproductive axis : perspectives and mechanisms.  
*Biol Reprod* **60**(2), 216-22.
- Dyer C.J., Simmons J.M., Matteri R.L., Keisler D.H. (1997)  
Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes.  
*Domestic Animal Endocrinology* **14**(2), 119-128.
- Erickson J.C., Hollopeter G., Palmiter R.D. (1996)  
Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y.  
*Science* **274**(5293), 1704-7.
- Geisthövel F., Jochmann N., Widjaja A., Horn R., Brabant G. (2004)  
Serum pattern of circulating free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in the physiological menstrual cycle.  
*Fertility and sterility* **81**(2), 398-402.
- Goumenou A.G., Matalliotakis I.M., Koumantakis G.E., Panidis D.K. (2003)  
The role of leptin in fertility.  
*Reprod Biol* **106**, 118-124.
- Gregoraszczuk E.L., Wojtowicz A.K., Ptak A., Nowak K. (2003)  
In vitro effect of leptine on steroids' secretion by FSH-and LH-treated porcine small, medium and large preovulatory follicles.  
*Reprod Biol* **3**(3), 227-39.

Harvey J., Ashford M.L.J. (2003)

Leptin in the CNS : much more than a satiety signal.

*Neuropharmacology* **44**, 845-854.

Henry B.A., Goding J.W., Alexander W.S., Tilbrook A.J., Canny B.J., Dunshea F., Rao A., Mansell A., Clarke I.J. (1999)

Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland : evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function.

*Endocrinology* **140**(3), 1175-82.

Holness M.J., Munns M.J., Sugden M.C. (1999)

Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function.

*Molecular and Cellular Endocrinology* **157**, 11-20.

Issad T., Strobel A., Camoin L., Ozata M., Donny Strosberg A. (1998)

La leptine : un signal pour le déclenchement de la puberté dans l'espèce humaine?

*Médecine/Sciences* **14**, 349-51.

Karlsson C., Lindell K., Svensson E., Bergh C., Lind P., Billig H., Carlsson L.M., Carlsson B. (1997)

Expression of functional leptin receptors in the human ovary.

*J Clin Endocrinol Metab* **82**, 4144-8.

Keisler D.H., Daniel J.A., Morrison C.D. (1999) voir

The role of leptin in nutritional status and reproductive function.

*J Reprod Fertil Suppl* **54**, 425-35.

Kile B.T., Schulman B.A., Alexander W.S., Nicola N.A., Martin H.M.E., Hilton D.J. (2002)

The SOCS box : a tale of destruction and degradation.

*Biochemical Sciences* **27**(5), 235-241.

Minegishi T., Tano M., Nakamura K., Nakamura M., Igarashi S., Ito I., Shinozaki H., Karino S., Ibuki Y., Miyamoto K. (1996)

Regulation of follicle-stimulating hormone receptor.

*Horm Res* **46**, 37-44.

Moschos S., Chan J.L., Mantzoros C.S. ( 2002)

Leptin and reproduction : a review.

*Fertility and sterility* **77**, 433-441.

Noel B., Perrad B., Mandiki S.M., Bister J.L., Paquay R. (1999)

Effects of season and phase of the estrous cycle on steroidogenesis and LH-FSH sensitivity of large ovine follicles perfused *in vitro*.

*Theriogenology* **51**(3), 559-68.

Ogura K., Irahara M., Kiyokawa M., Tezuka M., Matsuzaki T., Yasui T., Kamada M., Aono T. (2001)

Effects of leptin on secretion of LH and FSH from primary cultured female rat pituitary cells.

*Eur J Endocrinol* **144**(6), 653-8.

- O'Malley B.W. & Strod C.A. (1991)  
Steroid hormones : Metabolism and mechanism of action.  
*Reproductive Endocrinology* **2**, 156-180.
- Rannikki A.S., Zhang F-P., Huhtaniemi I.T. (1995)  
Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary.  
*Molecular and cellular Endocrinology* **107**, 199-208.
- Robel P. (1991)  
La stéroïdogenèse : les enzymes et la régulation de leur expression génomique.  
*INRA Ellipses* 127-134.
- Ruiz-Cortés Z.T., Martel-Kennes Y., Gévry N.Y., Downey B.R., Palin M-F., Murphy B.D. (2003)  
Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells.  
*Biology of reproduction* **68**, 789-796.
- Ryan N.K., Van der Hoek K.H., Robertson S.A., Norman R.J. (2003)  
Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary.  
*Endocrinology* **144**(11), 5006-13.
- Schneider J.E., Zhou D., Blum R.M. (2000)  
Leptin and metabolic control of reproduction.  
*Horm Behav* **37**(4), 306-26.
- Smith G.D., Jackson L.M., Foster D.L. (2002)  
Leptin regulation of reproductive function and fertility.  
*Theriogenology* **57**(1), 73-86.
- Spicer L.J., Francisco C.C. (1998)  
Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis.  
*Biol Reprod* **58**, 207-12.
- Spicer L.J. (2001)  
Leptin : a possible metabolic signal affecting reproduction.  
*Domestic Animal Endocrinolog* **21**, 251-270.
- Sweeney Gary (2002)  
Leptin signalling.  
*Cellular Signalling* **14**, 655-663.
- Trayhurn P., Hoggard N., Mercer J.G., Rayner D.V. (1999)  
Leptin : fundamenatl aspects.  
*Int J Obes Relat Metab Disord* **23** Suppl 1, 22-8.
- Ulloa-Aguirre A., Timossi C. (2000)  
Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins.  
*Reprod Biomed Online* **1**(2), 48-62.

Yu W.H., Kimura M., Walcewska A., Karanth S., McCann M. (1997)  
Role of leptin in hypothalamic-pituitary function.  
*Proc Natl Acad Sci* **94**, 1023-1028.

Zachow R.J., Magofin D.A. (1997)  
Direct intraovarian effects of leptin : impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells.  
*Endocrinology* **138**(2), 847-50.

Zamorano P.L., De Sevilla L., Mahesh V.B., Brann D.W. (1997)  
Production and refolding of recombinant leptin.  
*Biotechniques* **23**(5), 800-2, 804.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. (1994)  
Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.  
*Nature* **372**, 425-432.